

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 09070289 A

(43) Date of publication of application: 18 . 03 . 97

(51) Int. Cl      **C12N 15/09**  
**C07H 21/04**  
**C07K 14/705**  
**C07K 14/72**  
**C07K 16/28**  
**C12N 1/21**  
**C12P 21/02**  
**C12Q 1/68**  
**G01N 33/566**  
**// A61K 38/00**  
**A61K 38/00**  
**A61K 38/00**  
**A61K 38/04**  
**A61K 38/04**  
**(C12N 1/21 , C12R 1:19 ), (C12P  
21/02 , C12R 1:19 )**

(21) Application number: 07237081  
(22) Date of filing: 14 . 09 . 95  
(30) Priority: 27 . 06 . 95 JP 07161213

(71) Applicant: TAKEDA CHEM IND LTD  
(72) Inventor: HINUMA KUNIJI  
ITO YASUAKI  
FUKUZUMI MASASHI

(54) HUMAN CRF2 RECEPTER PROTEIN, ITS  
PRODUCTION AND USE

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new DNA for production, etc., of a human CRF<sub>2</sub> receptor protein having a specific base sequence and useful for a primer, etc., for polymerase chain reaction of DNA coding a G protein conjugated receptor protein.

SOLUTION: This new DNA has substantially same base sequence as a base sequence represented by formula I or II and is useful as a DNA primer, etc., used for polymerase chain reaction of DNA coding a G protein-conjugated receptor protein. This human CRF<sub>2</sub> receptor protein is obtained by expressing a gene cloned by polymerase chain reaction using the DNA as a primer. The receptor protein is useful for screening an agonist such as a preventing and treating agent for dementia or obesity or a hypotensive agent and an antagonist for prevention and treatment, etc., of depression, inflammatory diseases, AIDS, Alzheimer's disease, gastrointestinal injury, reproductive failure, Cushing's disease, hypotension, etc.

5'-CATTAYTKGATSGYGRCCAAC  
TWCWNCTGG-3'

5'-GTAGGARRYACCCACMAMRARN  
CCCTGRAA-3'

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-70289

(43)公開日 平成9年(1997)3月18日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup> C 12 N 15/09 C 07 H 21/04 C 07 K 14/705 14/72 16/28	識別記号 ZNA	序内整理番号 9162-4B	F I C 12 N 15/00 C 07 H 21/04 C 07 K 14/705 14/72 16/28	技術表示箇所 Z NAA B
--	-------------	-------------------	--	----------------------

審査請求 未請求 請求項の数23 OL (全46頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平7-237081  
(22)出願日 平成7年(1995)9月14日  
(31)優先権主張番号 特願平7-161213  
(32)優先日 平7(1995)6月27日  
(33)優先権主張国 日本(J P)

(71)出願人 000002934  
武田薬品工業株式会社  
大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号  
(72)発明者 日沼 州司  
茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武  
田春日ハイツ1402号  
(72)発明者 伊藤 康明  
茨城県土浦市桜ヶ丘町36番地の16  
(72)発明者 福住 昌司  
茨城県つくば市並木3丁目17番地の6 口  
イヤルシティ並木302号  
(74)代理人 弁理士 朝日奈 忠夫 (外2名)

(54)【発明の名称】ヒトCRF2レセプター蛋白質、その製造法および用途

(57)【要約】 (修正有)

【課題】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片のスクリーニングに有用なDNAプライマーの提供、さらにヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、その製造法および用途の提供。

【解決手段】公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域または第7膜貫通領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列に共通する塩基配列に相補的なDNA、該DNAを増幅しスクリーニングにより得られるDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチド、さらに、新規なヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、をコードするDNAを含有するDNA、該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の製造方法、及びスクリーニング用キットで得られるヒトCRF<sub>2</sub>レセプターゴニストまたはアンタゴニスト、及び該レセプターゴニストまたはアンタゴニストを含有する医薬組成物、該レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体に関する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：1または配列番号：2で表わされる塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有することを特徴とするDNA。

【請求項2】DNAがG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのポリメラーゼ・チェーン・リアクションに用いられるDNAプライマーである請求項1記載のDNA。

【請求項3】鋳型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAと請求項1記載のDNAを混合してポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行なうことを見特徴とする該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅する方法。

【請求項4】請求項1記載のDNAをDNAプライマーとしてポリメラーゼ・チェーン・リアクションに用いることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをスクリーニングする方法。

【請求項5】請求項4記載のスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA。

【請求項6】請求項5記載のDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩。

【請求項7】配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項8】配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩。

【請求項9】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。

【請求項10】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA。

【請求項11】配列番号：4で表される塩基配列を有する請求項10記載のDNA。

【請求項12】配列番号：15で表される塩基配列を有する請求項10記載のDNA。

【請求項13】請求項10記載のDNAを含有することを見特徴とするベクター。

【請求項14】請求項13記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項15】請求項14記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜にヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩の製造方法。

【請求項16】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩を用いることを特徴とするCRF<sub>2</sub>レセプターを活性化するアゴニストもしくはその塩またはCRF<sub>2</sub>レセプターとCRFとの結合を拮抗阻害するアンタゴニストもしくはその塩のスクリーニング方法。

【請求項17】(i) 請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii) 請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、リガンドと請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

【請求項18】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを見特徴とする、リガンドと請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

【請求項19】請求項16もしくは請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはその塩。

【請求項20】請求項16もしくは請求項17記載のスクリーニング方法または請求項18記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアンタゴニストまたはその塩。

【請求項21】請求項19記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはその塩を含有することを見特徴とする痴呆症、肥満症の予防・治療剤、ストレスに対する適応促進剤、ACTH、β-エンドルフィン、β-リボトロピンもしくはα-MSFの分泌促進剤、血圧降下剤、気分や行動の調節剤、胃腸機能の調節剤、自律神経系の調節剤、または下垂体、心血管系、消化管もしくは中枢神経の機能検査薬。

【請求項22】請求項20記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアンタゴニストまたはその塩を含有することを見特徴とするストレスからくる鬱病・不安・頭痛、炎症性疾患、免疫抑制、AIDS、アルツハイマー病、胃腸障害、食欲不振、出血性ストレス、薬物・アルコールの禁断症状、薬物依存症、生殖障害、クッシング病または低血圧症の予防・治療剤。

【請求項23】請求項7あるいは請求項8記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または請求項9記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ポリメラーゼ・チーン・リアクション用のDNAプライマーとして有用な新規DNA、該DNAを用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの増幅方法、該DNAを用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られるDNAおよびスクリーニング方法で得られたDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに関する。さらに、本発明は、新規なCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の製造方法、および該蛋白質ならびにDNAの用途に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として非常に重要な役割を担っている。それぞれの分子に対して特異的なレセプター蛋白質が存在し、それによって個々の生理活性物質の作用の特異性、すなわち標的細胞・臓器、薬理作用、作用強度、作用時間等を決定している。したがって、G蛋白質共役型レセプター遺伝子あるいはcDNAをクローニングすることができれば、G蛋白質共役型レセプターの構造、機能、生理作用等の解明に役立つばかりでなく、レセプターに作用する物質を探索することにより、医薬品を開発するためにも役に立つと考えられている。これまでいくつかのG蛋白質共役型レセプター遺伝子あるいはcDNAがクローニングされているが、また未知のG蛋白質共役型レセプター遺伝子が数多く存在すると考えられている。

【0003】これまでに知られているG蛋白質共役型レセプター蛋白質の特徴として、一次構造上に疎水性アミノ酸残基のクラスターが7個配置し、それぞれの部分で細胞膜を貫通していることがあげられる。この構造は公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質すべてに共通であり、また、この膜貫通領域およびその近傍のアミノ酸配列はしばしばレセプター間で高度に保存されていることが知られている。未知の蛋白質がこのような構造を有する場合、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の範疇に入ることを強く示唆する。また、一部のアミノ酸残基の配置には共通性があり、これらを特徴としてさらにG蛋白質共役型レセプター蛋白質であることが強く示唆される。公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の比較から得た共通のアミノ酸配列をもとに合成DNAプライマーを合成し、ポリメラーゼ・チーン・リアクション法（以下、PCR法と略称する場合がある）によって新規レセプター遺伝子の単離を行う方法がLibert F.らによって報告されている（Science 244: 569-572; 1989）。この報文において、Libert F.らは第3膜貫通領域および第6膜貫通領域の部分に相当する一組の合成DNAプライ

マーを用いている。しかし、一般にPCR法に用いるプライマーのデザインによって、増幅されるDNAの分子種が規定される。また、アミノ酸配列の類似性をもとにすれば、コドンの使用が異なった場合、プライマーの結合に影響を及ぼし、その結果、増幅効率の低下が引き起こされる。そのため、該DNAプライマーを用いて各種の新規レセプター蛋白質のDNAが得られてはいるが、すべてのレセプター蛋白質のDNAを増幅できるわけではない。

- 10 【0004】また、74種のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第1膜貫通領域～第7膜貫通領域に共通するアミノ酸配列がWilliam C. Probstらによって報告されている（DNA AND CELL BIOLOGY, Vol.11, No.1, 1992, pp 1-20）。しかし、これらアミノ酸配列をコードするDNAに相補的なDNAプライマーを用いるPCR法によって、新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをスクリーニングする方法については示唆されていない。したがって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはそれをコードするDNAの共通の配列を利用して、新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質のより全長に近い領域をコードするDNAを選択的に、かつ効率よくスクリーニングするためのPCR用DNAプライマーの開発が望まれていた。G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の機能を調節する物質を研究し、医薬品として開発を進める対象として非常に重要である。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用い、レセプター結合実験および細胞内情報伝達系を指標としたアゴニスト・アンタゴニストの評価実験等を行うことによって、新規医薬候補化合物の発見・開発を効率的に進めることができる。特に、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の存在を明らかにすれば、それに対する特異的な作用物質の存在が示唆される。新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを効率的にスクリーニングし単離することができれば、全コード領域を有するDNAの単離、発現系の構築、作用するリガンドのスクリーニングを効率的に進めることができる。
- 20 【0005】Corticotropin-Releasing Factor（以下、CRFと略称する）は、はじめ1981年にヒツジ視床下部から単離されたアミノ酸41個から成るペプチドで、下垂体からACTH/β-endorphin分泌を促進する活性を有する。その作用機構は、CRFが下垂体前葉のACTH産生細胞（Corticotroph）などのCRF標的細胞の細胞膜表面に存在するCRFレセプターに結合後、guanine nucleotide regulatory protein（G蛋白質）を介してadenylate cyclase-cyclic AMP-protein kinase系を活性化することによることが明らかにされている[Vale, W. et al.、サイエンス（Science）213巻、1394頁、1981年]。臨床的にも、合成CRFが下垂体機能低下症やCushing症候群の診断に広く応用されている。一方、CRFレセプターは下垂体のみならず、
- 30
- 40
- 50

大脳皮質灰白質、大脳基底核、視床下部室傍核、中央隆起外層、脳幹大脳神経核、オリーブ核、小脳神経核、小脳皮質、嗅索、前障、扁桃、脊髓角など中枢神経系内に広く分布している [Vale, W., コルチコトロピン・リリージング・ファクター (Corticotropin Releasing Factor) 、172巻、1-21頁、1993年]。この分布はCRFニューロン終末の分布とほとんど一致しており、CRFがこれらの部分でneurotransmitterあるいはneuromodulatorとして作用しているものと考えられている。その他、CRFレセプターは、副腎髄質、交感神経節、前立腺、脾臓、肝臓、腎臓、睾丸、赤血球膜、脾マクロファージにも存在し、ストレス時には、下垂体ACTH/ $\beta$ -endorphin分泌促進作用のみならず、これらのレセプターを介して、行動、自律神経あるいは免疫系の反応などすべてのストレス適応反応に関与しているものと推測されている。

【0006】中枢神経系に存在するCRFレセプターの性状については、よく研究されていて例えばヒトCRFレセプター cDNAはクローニングされており、動物細胞 (COS 7細胞 [Natalio Vita et al.、フェブス・レターズ (FEBS Letters) 、335巻、1-5頁、1993年]、COS 6M細胞 [Ruoping Chen et al.、プロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 、90巻、8967-8971頁、1993年] )での発現も報告されている。しかし、本CRFレセプター (以下、CRF<sub>1</sub>レセプターと記す) の体内での分布は、必ずしもCRFが作用する場所と一致していないことが判明していた。例えば、視床下部、脳幹、小腸、胃、精巣、心臓、骨格筋などには、CRFが作用することが示唆されていたが、CRF<sub>1</sub>レセプターは、ごくわずかしか存在しないか、全く存在しないことが示されていた [Owens, M. J., Nemeroff, C. B.、ファーマコロジカル・レビュー (Pharmacol. Rev.) 43巻、425頁、1991年]、[Grunt, M. et al.、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (Am. J. Physiol.) 264巻、H1124頁、1993年]、[Wei, E. T., Gao, G. C.、レギュラトリート・ペプチド (Regul. Pept.) 33巻、93頁、1991年]、[Lenz, H. J. et al.、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (Am. J. Physiol.) 249巻、R85頁、1985年]。これらのことから、CRF<sub>1</sub>レセプター以外にもCRFをリガンドとするレセプターが存在する可能性が考えられていた。

【0007】最近、相次いで、CRF<sub>1</sub>レセプターとは異なるCRFレセプター (以下、CRF<sub>2</sub>レセプターと記す) が、ラットおよびマウスからクローニングされた [Lovenberg, T. W. et al.、プロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92巻、836頁、1995年]、[Kishimoto, T. et al.、プロシージング

・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92巻、1108頁、1995年]、[Perrin, M. et al.、プロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユースエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 92巻、2969頁、1995年]。これによると、ラットCRF<sub>2</sub>レセプター cDNAは411個のアミノ酸をコードしており、CRF<sub>1</sub>レセプターとは約70%の相同性を有する7回膜貫通型のG蛋白質共役型レセプターである。またマウスCRF<sub>2</sub>レセプターは、431個のアミノ酸からなることが判明した (上記のマウスCRF<sub>2</sub>レセプターに関する論文中では、本明細書のCRF<sub>2</sub>レセプターをheart/muscle (HM)-CRFレセプターまたはCRF-レセプターBの用語で記載されている)。一方、ラットとマウスで明らかにされたCRF<sub>2</sub>レセプターがヒトでも存在するかどうかについてはまだ分かっていないなかつた。

【0008】CRFは多くの末梢組織 (例えば胎盤、副腎髄質、脾臓、肺、胃、十二指腸、肝臓) に存在しており、またCRFおよびCRF類似ペプチドのソイベジンやウロテンシンIの投与により、末梢組織の全身性の反応が引き起こされることが示されている [Lenz, H. J. et al.、アメリカン・ジャーナル・オブ・フィジオロジー (Am. J. Physiol.) 249巻、R85頁、1985年]。上記のラットおよびマウスのCRF<sub>2</sub>レセプターの研究から、中枢神経系の局所および末梢組織に分布しているCRFレセプターは、CRF<sub>2</sub>レセプターであることが強く示唆されている。以上のことから、CRF<sub>2</sub>レセプターに対するアゴニストあるいはアンタゴニストは、中枢神経系や末梢組織に作用する有用な薬物になり得ると期待される。ヒトの中枢神経系や末梢組織などに作用するような医薬としてのCRF<sub>2</sub>レセプターに対するアゴニストあるいはアンタゴニストをスクリーニングしようとする場合は、1次スクリーニングとしてはヒトのCRF<sub>2</sub>レセプターを発現している組織あるいは細胞を使ってそのレセプターに結合する物質をスクリーニングすることが考えられるが、ヒトのCRF<sub>2</sub>レセプターが未確認でそのようなヒトの組織入手することは事実上ほとんど不可能である。また、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターを発現しているような培養細胞も知られていない。一方、ラットやマウスのCRF<sub>2</sub>レセプターを発現している組織あるいは細胞を使ってスクリーニングすることは可能であるが、この場合には動物種間でのレセプターの特性の違い、いわゆるレセプターの種特異性が問題となってくる。以上に加えて、ヒトのCRF<sub>2</sub>レセプターのcDNAが取得されていなかったため、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターのシグナル伝達について調べる手段が全くなかった。【0009】このような問題を解決する手段として、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター cDNAをクローニングすること 50 ができれば、それを使って適当な手段によりヒトCRF

,レセプターを昆虫細胞や動物細胞等に発現させることができるので、ヒトのCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストあるいはアンタゴニストの探索および研究を大きく前進させることができるものと考えられるが、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質のcDNAについての知見は全くなかった。すなわち、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を使用してCRF<sub>2</sub>レセプターのアゴニスト／アンタゴニストをスクリーニングすることができれば、実験動物を用いることの欠点（例えば、種が異なることにより、ヒトに対して効果を発揮できない化合物が得られる可能性があることなど）を克服することができ、ヒトに対して有効な医薬の開発が効率よく行えるようになると期待される。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、PCR用のDNAプライマーとして有用な新規DNA、該DNAを用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAの増幅方法、該DNAを用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのスクリーニング方法、該スクリーニング方法で得られるDNAおよびスクリーニング方法で得られたDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを提供するものである。さらに、本発明は、ヒトの中枢神経系や末梢組織などに作用するヒトのCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストあるいはアンタゴニストのスクリーニングなどに有用な新規ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAおよび該蛋白質の製造法およびその用途を提供するものである。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、効率よくG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを採取することができれば、その中に新規レセプター蛋白質をコードするDNAが含まれていた場合にそれを遺伝子組み換え技術によって発現させ、今後の研究、医薬品開発に多大な効果を奏することができると考え、鋭意研究を重ねた結果、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域または第7膜貫通領域をコードする塩基配列の類似性に基づいて新規なDNAプライマーを合成することに成功した。そして、これらのDNAプライマーを用いてPCRを行うことによって予想外にもG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）を効率よく増幅することに成功した。すなわち、本発明者らは、該DNAプライマーを用いて各種DNAの増幅、解析を行うことによって新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを得ることができることを見いだした。

【0012】より具体的には、本発明者らは、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域および第7膜貫通領域付近に共通するアミノ酸配列を選び、第3膜貫通領域に共通するアミノ酸配列をコードするDNAプライマー（配列番号：1）、および第7膜貫通領域

10

20

30

40

50

付近に共通するアミノ酸配列をコードする塩基配列に相補的なDNAプライマー（配列番号：2）を設計した。これらのDNAプライマーは、これまでに報告されている類似のDNAプライマーとは塩基配列が異なっており、新規なDNAプライマーである。特に、PCRにおいて伸長反応が効率的に行うことができるよう、プライマーの3'末端部分に多くのレセプター蛋白質において共通している塩基配列を使用している。その他の部分においても塩基配列の類似性を活かし、なるべく多くのレセプター蛋白質のDNAと塩基配列が一致するよう混合塩基部分を設定した。そして、本発明者らは、上記したDNAプライマーを用いてヒト由来のcDNAをPCRにより増幅することに成功し、その解析を進めた。その結果、本発明者らは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするヒト由来のcDNAを単離し、その部分的な構造を決定することに成功した。そして、このcDNAは、ラットおよびマウスのCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質とDNAおよびアミノ酸配列の高い相同意識が認められたことから、ヒトの胃で発現機能している新規なCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードしているDNAであることを見いだした。これらの知見から、このDNAを用いれば、完全長の翻訳枠を持つcDNAを入手することができ、該レセプター蛋白質を製造することができる。さらに、該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で発現させることによって得られる該レセプター蛋白質を用いれば、レセプター結合実験または細胞内セカンドメッセンジャーの測定などを指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物から該レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができ、さらには、リガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うこともできる。

【0013】より具体的には、本発明者らは、〔図3〕に示すヒト胃由来の新規なcDNA断片をPCR法によって増幅し、プラスミドベクターにサブクローニングした（p hs-AH1）。その部分配列の解析から、該cDNAが新規レセプター蛋白質をコードしていることが明らかになった。この配列をアミノ酸配列に翻訳したところ〔図3〕、第3、第4、第5、第6および第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された〔図4〕。また、増幅されたcDNAのサイズも、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域と第7膜貫通領域の間の塩基数と比較して同程度の約0.5kbであった。G蛋白質共役型レセプター蛋白質はそのアミノ酸配列にある程度の共通性を示し、一つの蛋白質ファミリーを形成している。そこで、本件の新規レセプター蛋白質DNA（p hs-AH1に含まれるcDNA）によってコードされるアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行ったところ、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるラットCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質（U1623

5)、マウスCRFレセプターB蛋白質(U1785  
8)とそれぞれ96.6%および93.9%の相同性が認められ【図5】、本件の新規レセプター蛋白質DNAが、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードしていることが判明した。さらにこれを基にPCR法を用いてヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の全長をコードするcDNA断片を取得し、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を明らかにした【図6および図7】。

【0014】すなわち、本発明は、(1)配列番号：1または配列番号：2で表わされる塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有することを特徴とするDNA、(2)DNAがG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのポリメラーゼ・チェーン・リアクションに用いられるDNAプライマーである第(1)項記載のDNA、(3)鋳型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAと第(1)項記載のDNAを混合してポリメラーゼ・チェーン・リアクションを行なうことを特徴とする該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅する方法、(4)第(1)項記載のDNAをDNAプライマーとしてポリメラーゼ・チェーン・リアクションに用いることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するDNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをスクリーニングする方法、(5)第(4)項記載のスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA、(6)第(5)項記載のDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、

【0015】(7)配列番号：3で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩、

(8)配列番号：14で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩、(9)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、(10)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、(11)配列番号：4で表される塩基配列を有する第(10)項記載のDNA、(12)配列番号：15で表される塩基配列を有する第(10)項記載のDNA、(13)第(10)項記載のDNAを含有することを特徴とするベクター、(14)第(13)項記載のベクターを保持する形質転換体、(15)第(1)項記載の形質転換体を培養し、形質転換体の細胞膜にヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を生成せしめることを特徴とする第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩の製造方法、(16)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>

レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を用いることを特徴とするCRF<sub>2</sub>レセプターを活性化するアゴニストもしくはその塩またはCRF<sub>2</sub>レセプターとCRFとの結合を拮抗阻害するアンタゴニストもしくはその塩のスクリーニング方法、(17)(i)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と(ii)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする、リガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする方法、(18)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とする、リガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、(19)第(16)項もしくは第(17)項記載のスクリーニング方法または第(18)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはその塩、(20)第(16)項もしくは第(17)項記載のスクリーニング方法または第(18)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られるヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアンタゴニストまたはその塩、(21)第(19)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはその塩を含有することを特徴とする痴呆症、肥満症の予防・治療剤、ストレスに対する適応促進剤、ACTH、β-エンドルフィン、β-リポトロピンもしくはα-MSFの分泌促進剤、血圧降下剤、気分や行動の調節剤、胃腸機能の調節剤、自律神経系の調節剤、または下垂体、心血管系、消化管もしくは中枢神経の機能検査薬、(22)第(20)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアンタゴニストまたはその塩を含有することを特徴とするストレスからくる鬱病・不安・頭痛、炎症性疾患、免疫抑制、AIDS、アルツハイマー病、胃腸障害、食欲不振、出血性ストレス、薬物・アルコールの禁断症状、薬物依存症、生殖障害、クッシング病または低血圧症の予防・治療剤、および(23)第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体を提供する。

【0016】より具体的には、(24)DNAが、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1又は2個以上のヌクレオチドが欠失した塩基配列、配列

番号：1または配列番号：2で表される塩基配列に1または2個以上のヌクレオチドが付加した塩基配列、あるいは配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1または2個以上のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換された塩基配列を有するDNAである第

(1) 項記載のDNA、(25) 蛋白質が、配列番号：3で表されるアミノ酸配列、配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：3で表されるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：3で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(7)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩、(26) 蛋白質が、配列番号：14で表されるアミノ酸配列、配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、配列番号：14で表されるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、あるいは配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を含有する蛋白質である第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩、

【0017】(27) 標識したリガンドを第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(28) 標識したリガンドを第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(29) 標識したリガンドを第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCR

RF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分に接触させた場合における、標識したリガンドの該細胞の膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(30) 標識したリガンドを第(14)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンド

10 および試験化合物を第(14)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識したリガンドの該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(31) 第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を活性化する化合物を第(7)項あるいは第(8)項記

20 載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、(32) 第(7)項ある

30 いは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を活性化する化合物を第(14)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質に接触させた場合と、第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を活性化する化合物および試験化合物を第(14)項記載の形質転換体を培養することによって該形質転換体の細胞膜に発現したヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質に接触させた場合における、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性を測定し、比較することを特徴とするリガンドと第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

40 【0018】(33) 第(17)項、第(27)項～第(32)項記載のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩、(34) 第(33)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、(35) 第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞を含有することを特徴とする第(18)項記載のスクリーニング用キット、(36) 第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCR

$F_2$ レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有することを特徴とする第(18)項記載のスクリーニング用キット、(37)第(18)項、第(35)項または第(36)項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩、(38)第(37)項記載の化合物またはその塩を含有することを特徴とする医薬組成物、および(39)第(23)項記載の抗体と、第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩とを接触させることを特徴とする第(7)項あるいは第(8)項記載のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または第(9)項記載の部分ペプチドもしくはその塩の定量法を提供する。

【発明の実施の形態】

【0019】本発明のDNAは、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有するDNAである。すなわち、配列番号：1で表わされる塩基配列は、

5'-CATTAYTKGATSGYGRCCAACT  
WCWNCTGG-3'

〔YはTまたはCを示し、KはGまたはTを示し、SはCまたはGを示し、RはAまたはGを示し、WはAまたはTを示し、NはIを示す。〕である〔図1〕。配列番号：2で表わされる塩基配列は、

5'-GTAGARRYAGCCACMAMRARN  
CCCTGRAA-3'

〔RはAまたはGを示し、YはTまたはCを示し、MはAまたはCを示し、NはIを示す。〕であり、これは5'-TTYCAGGGNYTYKTGTTGGCTR  
TYYTCTAC-3'

〔YはTまたはCを示し、NはIを示し、KはGまたはTを示し、RはAまたはGを示す。〕で表わされる塩基配列〔図2〕に相補的な塩基配列である。

【0020】本発明のDNAとしては、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAなどの他に、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列と約70～99.9%の相同性を有する塩基配列を有し、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAと実質的に同質の機能を有するDNAなどが挙げられる。実質的に同質の機能としては、例えばDNAプライマーの結合機能、增幅効率などが挙げられる。実質的に同質とは、DNAプライマーの結合機能やプライマー活性が性質的に同質であることを示す。より具体的には、本発明のDNAとしては、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAなどが挙げられる。また、本発明のDNAとしては、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1または2個以上のヌクレオチドが欠失した塩基配列、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列に1または2個以上のヌクレオチドが付加した塩

基配列、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1または2個以上のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換された塩基配列を有するDNAなども挙げられる。さらに具体的には、本発明のDNAとしては、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列を有するDNAなどの他に、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列中の1または2個以上（好ましくは、2個以上9個以下、より好ましくは2個以上6個以下）のヌクレオチドが欠失したもの、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列に1または2個以上（好ましくは、2個以上9個以下、より好ましくはDNA2個以上6個以下）のヌクレオチドが付加したもの、配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列に1または2個以上（好ましくは、2個以上9個以下、より好ましくはDNA2個以上6個以下）のヌクレオチドが他のヌクレオチドで置換されたものなどが挙げられる。

【0021】配列番号：1および配列番号：2で表される塩基配列は、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質、すなわち、ヒトカルシトニンレセプター(X82466)、ヒトパラチロイドホルモンレセプター(X68596)、ヒトグルカゴンレセプター(U03469)、ヒトグルカゴン-ライクポリペプチド-1レセプター(U01156)、ラットセクレチンレセプター(X59132)、ヒトグロースホルモン放出ホルモンレセプター(L01406)、ヒトピチュイタリーアデニレートサイクレースーアクティベートポリペプチドレセプター(D17516)、ラットピチュイタリーアデニレートサイクレースーアクティベートポリペプチドレセプター(Z23279)、ヒトバソアクティブインテスティナルペプチドレセプター(X75299)、ヒトビップ2レセプター(L36566)、ヒトコルチコトロピン放出ファクターレセプター(L23332)、およびラットコルチコトロピン放出ファクター2レセプター(U16253)などの第3および第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列に共通して存在する塩基配列である〔図1および図2〕。上記の（）内の略語は、GenBank/EMBL Data Bankにデータとして登録される際の整理番号であり、通常Accession Numberと呼ばれているものである。

【0022】本発明のDNAは、それ自体公知のDNA合成法あるいはそれに準じる方法に従って、製造することができる。たとえば、固相合成法、液相合成法のいずれによてもよい。公知の合成法としてはたとえば、以下の①～③に記載された方法が挙げられる。

①池原森男他、核酸有機化学、化学同人(1979年)  
②G. H. BlackburnおよびM. J. Gait, Nucleic Acids in Chemistry and Biology, IRL Press, Oxford (1989年)  
③大塚栄子および井上英夫、日本臨床、47巻、87頁(19

89年)

また、市販のDNA自動合成機を用いることもできる。本発明のDNAのうち、配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNAは前述の公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列に共通して存在する塩基配列であり、また配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAは第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列に共通して存在する塩基配列に相補的な塩基配列であるので、該公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（ゲノムDNA、cDNA）またはRNAに相補的に結合することができる。さらに、これらの公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA・RNAに限らず、本発明のDNAの塩基配列に類似した塩基配列を有する他の公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAまたはRNAや未知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAまたはRNAにも相補的に結合することができる。したがって、本発明のDNAはPCR用のDNAプライマーとして用いることができる。例えば、鑄型となる微量のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）と本発明のDNAプライマーを混合してPCRを行なうことによって、該レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）を増幅することができる。具体的には、配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNAプライマーを用いてPCR法を行なうと、該DNAプライマーは鑄型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）あるいはRNAの第3膜貫通領域に相当する塩基配列に結合し、5'側から3'側へDNAを伸長していく。一方、配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAプライマーを用いてPCR法を行なうと、該DNAプライマーは鑄型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）あるいはRNAの第7膜貫通領域に相当する塩基配列に結合し、3'側から5'側へDNAを伸長していく。すなわち、本発明の配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNAプライマーおよび配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNAプライマーを用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域部分をコードするDNA（断片）を増幅することができる。

【0023】この増幅方法は、公知のPCR法に従って実施することができる。例えば、Saiki R.K. et al. Science, 239:487-491(1988)に記載の方法に従って実施することができる。PCR法の温度、時間、バッファー、サイクル数、DNAポリメラーゼなどの酵素、2'-deoxy-7-deaza-guanosine triphosphateやInosineの添加などは対象DNAの種類などに応じて適宜選択することができる。またRNAを鑄型として用いる場合は、Saiki R.K. et al. Science, 239:487-491(1988)に記載の方法な

どに従って行なう。さらに、本発明のDNAは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域または第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列に相補的に結合することができるので、ある種のDNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）をスクリーニングするためのプローブとしても有用である。本発明のDNAをプローブとして用いてDNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）をスクリーニングするには、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。特に、本発明のDNAをPCR法のDNAプライマーとして使用すれば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）の増幅とスクリーニングとを一挙に行なうことができる。すなわち、本発明のDNAをPCR用のDNAプライマーとして使用すれば、該DNAプライマーはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域のアミノ酸配列をコードするDNA（断片）あるいはRNAに結合し、該DNAを増幅していくことができるので、本発明のDNAプライマーはDNAライブラリーの中からG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域のアミノ酸配列をコードするDNA（断片）のみを選択的に増幅することができる。そして、増幅されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域部分のアミノ酸配列をコードするDNA（断片）をプローブとして用い、それ自体公知の方法に従って、DNAライブラリーからG蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAをスクリーニングすることができる。

【0024】すなわち、本発明は、本発明のDNAをPCR用DNAプライマーとして用いることを特徴とするレセプター蛋白質をコードするDNA（断片）を含有するDNAライブラリーあるいは組織・細胞由来のRNAからG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）をスクリーニングする方法を提供する。具体的には、本発明は、本発明のDNAをPCR用のDNAプライマーとして用い、該DNAプライマーと鑄型となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）を含有するDNAライブラリーとを混合しPCR法を行ない、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の第3膜貫通領域から第7膜貫通領域部分をコードするDNAを増幅し選択し（すなわち、スクリーニングし）、これをプローブとして自体公知の方法を用いて、DNAライブラリーから完全な長さを持つG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをクローニングする方法を提供する。クローニングされたDNAの解析はDNAシークエンサーを用いて行なうことができる。本発明のDNAを用いるPCR法による増幅およびスクリーニングの対象となるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコード

するDNA(断片)またはRNAとしては、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)またはRNAであってもよいし、新規なG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)またはRNAであってもよい。例えば、脊椎動物(例えば、マウス、ラット、ネコ、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、ヒトなど)のあらゆる組織(例えば、下垂体、脳、臍臓、肺、副腎など)、昆虫もしくはその他の無脊椎動物(例えば、ショウジョウバエ、カイコ、ヨトウガなど)、植物(例えば、イネ、コムギ、トマトなど)およびそれらに由来する培養細胞株由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)またはRNAなどが挙げられる。具体的には、例えばカルシトニン、パラチロイドホルモン(PTH)、グルカゴン、グルカゴン-ライクポリペプチド-1、セクレチン、グロースホルモン放出ホルモン(GHRH)、PACAP、VIP、VIP2、CRFなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)またはRNAなどが挙げられる。本発明のDNAを用いたPCR法による増幅の鋳型とするDNA(断片)としては、上記の組織・細胞由来のものであればいかなるものであってもよい。より具体的には、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、組織・細胞由来のcDNA、組織・細胞由来のcDNAライブラリーのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりmRNA画分を調整したものを用いて直接にRT-PCR法によって増幅することもできる。鋳型となるDNAは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAであってもよいし、そのDNA断片であってもよい。本明細書では、これらをまとめてDNA(断片)と表記する場合がある。

【0025】DNAのクローニングの手段としては、該DNAの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または該DNAの一部あるいは全領域を有するDNAもしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば Molecular Cloning 2nd ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989 に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なう。したがって、本発明のDNAを用いるスクリーニング方法で得られるDNA(断片)は、DNAライブラリーなどに含まれているG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)である。すなわち、具体的には、カルシトニン、PTH、グルカゴン、グルカゴン-ライクポリペプチド-1、セクレチン、GHRH、PACAP、VIP、VIP2、CRFなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA(断片)であ

30

40

50

る。該スクリーニング方法で得られたDNA(断片)をプローブとして用いることによって、適当なDNAライブラリーからそれ自体公知のDNAのスクリーニング方法に従って、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAを単離することができる。

【0026】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。また、該DNAをプローブとしてノザンプローティングを行なって、該レセプター蛋白質が発現している組織・細胞などを決定することができる。また、全コード領域を有するDNAを適当なプロモーターと連結して動物細胞に導入することによりレセプター蛋白質を発現させることができる。本発明のスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質は、具体的には、カルシトニン、PTH、グルカゴン、グルカゴン-ライクポリペプチド-1、セクレチン、GHRH、PACAP、VIP、VIP2、CRFなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質である。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質は、温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。

【0027】該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域(親水性(Hydrophilic)部位)であると分析された部分ペプチドである。また、疎水性(Hydrophobic)部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。さらに、個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分ペプチドでもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に

記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti, ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②Schroeder および Luebke, ザ ペプチド (The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他, ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および 榊原俊平, 生化学実験講座 1, タンパク質の化学IV, 205, (1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製単離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適用な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。さらに、該部分ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0028】本発明のDNAを用いた前述のスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）および該DNAにコードされるG蛋白質共役型レセプター蛋白質または部分ペプチドは、例えば、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定や該レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニングなどに使用することができる。この場合、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA（断片）の発現系を構築する。宿主として用いるものは動物細胞、昆虫細胞、酵母、枯草菌、大腸菌などいずれでも良く、用いるプロモーターとしては遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものであっても良い。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。構築した発現細胞をそのまま、あるいはそれより公知の方法に従って膜画分を調製し、結合実験に供することができる。用いるリガンドは、市販の放射性同位元素等による標識化合物、また培養上清、組織抽出物等を直接クロラミンT法やラクトペルオキシダーゼ法によって標識化したものでもよい。結合・遊離のリガンドの分離は、基質に接着している細胞を用いた場合はそのまま洗

浄によって行い、浮遊細胞あるいは膜画分の場合は遠心分離あるいはろ過によって行っても良い。容器等への非特異結合は、投入した標識リガンドに対して100倍程度の濃い非標識リガンドの添加によって推定できる。

【0029】このような結合実験によって得られたリガンドについて、アゴニスト・アンタゴニストの判別を行なうことができる。具体的には、該レセプター蛋白質を発現している細胞とリガンドであることが予想される天然物・化合物をインキュベートし、その後培養上清を回

10 収あるいは細胞を抽出する。これらに含まれる成分の変化を、例えば市販の測定キット (cAMP、ジアシルグリセロール、cGMP、プロテインキナーゼAなど) で測定する。また公知の方法に従い、Fura-2、[<sup>3</sup>H]アラキドン酸、[<sup>3</sup>H]イノシトールリン酸代謝物の遊離等を測定することもできる。このようにスクリーニングして得た化合物、天然物は該レセプター蛋白質に対するアゴニストあるいはアンタゴニストであり、該レセプターが分布する組織・細胞に作用することが予測される。そのため、ノーザンプロッティング等によって明らかな分布を参考にすることによって、よりその薬効を効率的に探索することが可能である。

20 また、例えば中枢神経組織、循環系、腎臓、肺臓等において、新しい薬効を持つ化合物が望まれる。組織より選択的にG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅することによって、これらを用いてより効率的に医薬の開発を進めることができる。

【0030】以下に、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAのスクリーニング方法で得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするD

NA（断片）および該DNAを発現させて得られるG蛋白質共役型レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩（以下、塩を含めてG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドと略称する）の有用性について、以下に詳細に説明する。

#### (1) G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドを探査しましたは決定するための試薬として有用である。すなわち、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドと、試験化合物とを接触させることを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。試験化合物としては、公知のリガンド（例えば、アンギオテンシン、ボンベシ、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、ブリン、パソプレッシン、オキシトシン、VIP（パソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン、モチリシン、アミリン、プラジキニン、CGRP（カルシトニン

ジーンリーティッドペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$  および $\beta$ -chemokine (IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、カルシトニン、パラチロイドホルモン、グルカゴン、セクレチン、GHRH、PACAP、CRFなど) の他に、例えば温血動物(例えば、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、サル、ヒトなど)の組織抽出物、細胞培養上清などが用いられる。例えば、該組織抽出物、細胞培養上清などをG蛋白質共役型レセプター蛋白質に添加し、細胞刺激活性などを測定しながら分画し、最終的に单一のリガンドを得ることができる。

【0031】具体的には、該リガンド決定方法は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを用いるか、または組み替え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C $a^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化などを促進する活性または抑制する活性)を有する化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を決定する方法である。該リガンド決定方法においては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質または部分ペプチドと試験化合物とを接触させた場合の、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対する試験化合物の結合量、細胞刺激活性などを測定することを特徴とする。

【0032】より具体的には、

①標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドもしくはその塩に接触させた場合における、標識した試験化合物の該蛋白質もしくはその塩、または該部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

②標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識した試験化合物の該細胞または該膜画分に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

③標識した試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養す

ることによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した試験化合物の該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、

④試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C $a^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑤試験化合物を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C $a^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0033】リガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclear polyhedrosis virus; NPV)のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行

うことができる。例えば、文献[Nambi, P. ら、ザ・ジ

ヤーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. B.iol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。

【0034】したがって、リガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従つて精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。リガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従つて行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm~3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm~30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3$ ~ $10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5$ ~ $10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0035】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の①~③の方法を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した試験化合物が必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した試験化合物としては、 $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、

$[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識したアンギオテンシン、ポンベシ、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、バソプレッシン、オキシトシン、VIP (バソアクティブ インテスティナルアンド リレイテッド ペプチド)、ソマトスタチン、ドーパミン (D5 ドーパミンなど)、モチリン、アミリン、プラジキニン、CGRP (カルシトニンジーンリレーティッド ペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、 $\alpha$ および $\beta$ -chemokine (IL-8、GRO $\alpha$ 、GRO $\beta$ 、GRO $\gamma$ 、NAP-2、ENA-78、PF4、IP10、GCP-2、MCP-1、HC14、MCP-3、I-309、MIP1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、RANTESなど)、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプタイド、ガラニン、カルシトニン、パラチロイドホルモン、グルカゴン、セクレチン、GHRH、PACAP、CRFなどが好適である。

【0036】具体的には、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4~10 (望ましくは pH 6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80 (花王アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるリセプターやリガンドの分解を抑える目的でPM-SF、ロイペプチド、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプチダーゼなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml~10 mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000 cpm~500000 cpm) の $[^3H]$ 、 $[^{125}I]$ 、 $[^{14}C]$ 、 $[^{35}S]$ などで標識した試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターあるいは $\gamma$ -カウンターで計測する。全結合 (B) からNSBを引いたカウント (B-NSB) が0 cpmを越える試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0037】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の④～⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内C<sub>a</sub><sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

【0038】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法に用いるキットとしては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分などを含有するものなどが挙げられる。リガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. リガンド決定用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個/穴で継代し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

##### ③標識試験化合物

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識した化合物、または適当な方法で標識化したもの水溶液の状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。水に難溶性を示す試験化合物については、ジメチルホルムアミド、DMSO、メタノール等に溶解する。

##### ④非標識試験化合物

標識化合物を同じものを100～1000倍濃い濃度に調製する。

#### 【0039】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②標識試験化合物を5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには非標識試験化合物を5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識試験化合物を0.2N NaOH-1% SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定する。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合することができるリガンドとしては、例えば脳、下垂体などに特異的に存在する物質などが挙げられ、具体的にはアンギオテンシン、ポンベシ、カナビノイド、コレシストキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オピオイド、プリン、パソプレッシン、オキシトシン、VIP（パソアクティブ インテスティナル アンド リレイテッド ペプチド）、ソマトスタチン、ドーパミン（D5ドーパミンなど）、モチリン、アミリン、プラジキニン、CGRP（カルシトニンジーンリレーティッドペプチド）、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、パンクレアスタチン、プロスタノイド、トロンボキサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ-chemokine (IL-8, GROα, GROβ, GROγ, NAP-2, ENA-78, PF4, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1α, MIP1β, RANTESなど）、エンドセリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、パンクレアティックポリペプチド、ガラニン、カルシトニン、パラチロイドホルモン、グルカゴン、セクレチン、GHRH、PACAP、CRFなどが挙げられる。

#### 【0040】(2) G蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

上記(1)の方法において、G蛋白質共役型レセプター

蛋白質に対するリガンドが明らかになれば、該リガンドが有する作用に応じて、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAをG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として低毒性で安全に使用することができる。例えば、生体内においてG蛋白質共役型レセプター蛋白質が減少しているためにリガンドの生理作用が期待できない患者がいる場合に、(イ) G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現されることによって、あるいは(ロ) 脳細胞などにG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該脳細胞を該患者に移植

することなどによって、該患者の脳細胞におけるG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量を増加させ、リガンドの作用を充分に発揮させることができる。したがって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性なG蛋白質共役型レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤などとして用いることができる。

【0041】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを上記治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従つて実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスター、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80(TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0042】また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールな

ど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは1.0～50mg、より好ましくは1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは0.1～20mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0043】(3) G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの定量法

G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドは、リガンドに対して結合性を有しているので、生体内におけるリガンド濃度を感度良く定量することができる。この定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体をG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドと接触させることによって被検体中のリガンド濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従つて

30 用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）

②入江寛編「統ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）

【0044】(4) G蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドの結合を阻害する化合物のスクリーニング方法  
G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物（いわゆるG蛋白質共役型レセプ

ターアゴニスト) と該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト)などが含まれる。すなわち、(i) ①G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または部分ペプチドもしくはその塩および②リガンドを接触させた場合と(ii) ①G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または部分ペプチドもしくはその塩、②リガンドおよび③試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。該スクリーニング方法においては、(i) ①G蛋白質共役型レセプター蛋白質または部分ペプチドおよび②リガンドを接触させた場合と(ii) ①G蛋白質共役型レセプター蛋白質または部分ペプチド、②リガンドおよび③試験化合物を接触させた場合における、例えば該G蛋白質共役型レセプター蛋白質または該部分ペプチドに対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

## 【0045】より具体的には、

①標識したリガンドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドに接触させた場合における、標識リガンドの該蛋白質またはその部分ペプチドもしくはその塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

②標識リガンドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜画分に接触させた場合における、標識リガンドの該細胞または該膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

③標識リガンドを、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、標識したリガンドおよび試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、標識リガンドの該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

④G蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化する化合物

(例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど)を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介した細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物(例えば、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドなど)を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、G蛋白質共役型レセプターを活性化する化合物および試験化合物をG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することを特徴とするリガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

【0046】このスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の臓器の膜画分が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組換え体を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現

させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行うことができる。したがって、スクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

【0047】スクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことという。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速 (500 rpm~3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm~30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり $10^3$ ~ $10^6$ 分子であるのが好ましく、 $10^5$ ~ $10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0048】リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物をスクリーニングする前記の①~③を実施するためには、適當なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識したリガンドが必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば [ $^3$ H]、 [ $^{125}$ I]、 [ $^{14}$ C]、 [ $^{35}$ S] などで標識されたリガンドなどを利用することができる。具体的には、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4~10 (望ましくはpH 6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドXとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup> (花王アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチド、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml~1.0 mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000 cpm~500000 cpm) の標識したリガンドを添加し、同時に $10^{-4}$ M~ $10^{-10}$  Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識のリガンドを加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス纖維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス纖維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーターまたはγカウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント ( $B_0$ ) からNSBを引いたカウント ( $B_0 - NSB$ ) を100%とした時、特異的結合量 ( $B - NSB$ ) が例えば50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

【0049】リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物スクリーニングする前記の④~⑤の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリシン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、

c-fosの活性化などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を有する細胞株(例えば、マウス肺臓β細胞株MINT6など)、前述の組換え型G蛋白質共役型レセプター蛋白質発現細胞株などが望ましい。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0050】リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチド、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいはG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。スクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### 1. スクリーニング用試薬

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution(ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4°Cで保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②G蛋白質共役型レセプター標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個/穴で継代し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したものの。

##### ③標識リガンド

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したリガンド

水溶液の状態のものを4°Cあるいは-20°Cにて保存

し、用時に測定用緩衝液にて1μMに希釈する。

##### ④リガンド標準液

リガンドを0.1%ウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20°Cで保存する。

#### 【0051】2. 測定法

①12穴組織培養用プレートにて培養したG蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②10<sup>-3</sup>～10<sup>-10</sup>Mの試験化合物溶液を5μl加えた後、標識リガンドを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物のかわりに10<sup>-3</sup>Mのリガンドを5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA(和光純薬製)と混合する。

④液体シンチレーションカウンター(ベックマン社製)を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding(PMB)を次の式【数1】で求める。

#### 【0052】

#### 【数1】

$$PMB = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

#### 【0053】PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding(非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物であり、具体的にはG蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩(いわゆるG蛋白質共役型レセプターアゴニスト)、あるいは該刺激活性を有しない化合物(いわゆるG蛋白質共役型レセプターアンタゴニスト)である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0054】該G蛋白質共役型レセプターアゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。逆に、G蛋白質共役型レセプターアンタゴニストは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドが有する生理活性を抑制することができるので、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実

施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用10量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようになるものである。

【0055】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスター10チ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリソの甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（たとえば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（たとえば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（たとえば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（たとえば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性があるので、たとえば温血哺乳動物（たとえば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは1.0～50mg、より好ましくは1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象

臓器、症状、投与方法などによって異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは0.1～20mg程度、より好ましくは0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

【0056】（5）本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清の製造

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清は、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体の製造法に従って製造することができる。例えれば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

【0057】【モノクローナル抗体の作製】

（a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩（以下、G蛋白質共役型レセプターと略称する場合がある）は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、たとえばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。

抗血清中の抗体価の測定は、たとえば後記の標識化G蛋白質共役型レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール（PEG）やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髄腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、A50-P-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いら

れる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1~20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000~PEG6000）が10~80%程度の濃度で添加され、20~40℃、好ましくは30~37℃で1~10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗G蛋白質共役型レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえばG蛋白質共役型レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したG蛋白質共役型レセプターを加え、固相に結合した抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20~40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗G蛋白質共役型レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### 【0058】(b) モノクローナル抗体の精製

抗G蛋白質共役型レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換法（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。以上の（1）および（2）の方法に従って製造させる本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体は、G蛋白質共役型レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量、特にサンドイ

ッヂ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、

- 【0059】(i) 本発明のG蛋白質共役型レセプターに反応する抗体と、被検液および標識化G蛋白質共役型レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化G蛋白質共役型レセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法、(ii) 被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法において、一方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がG蛋白質共役型レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のG蛋白質共役型レセプターの定量法を提供する。本発明のG蛋白質共役型レセプターを認識するモノクローナル抗体（以下、抗G蛋白質共役型レセプター抗体と称する場合がある）を用いてG蛋白質共役型レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のF(a'b')<sub>2</sub>、Fa'b'、あるいはFa'b'画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばG蛋白質共役型レセプター量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッヂ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッヂ法を用いるのが特に好ましい。
- 【0060】標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば<sup>[125]I</sup>、<sup>[131]I</sup>、<sup>[3H]</sup>、<sup>[14]C</sup>などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えばβ-ガラクトシダーゼ、β-グルコシダーゼ、アルカリフェヌラーゼ、ペーオキシダーゼ、リソグロ酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネットなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の

合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗G蛋白質共役型レセプター抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗G蛋白質共役型レセプター抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のG蛋白質共役型レセプター量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時にあってもよいし時間をずらして行なつてもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

【0061】本発明のサンドイッチ法によるG蛋白質共役型レセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗G蛋白質共役型レセプター抗体はG蛋白質共役型レセプターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、G蛋白質共役型レセプターのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレンギリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通

常の技術的配慮を加えてG蛋白質共役型レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」

- 10 (第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunological Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。以上のように、本発明のG蛋白質共役型レセプター抗体を用いることによって、G蛋白質共役型レセプターを感度良く定量することができる。
- 【0062】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質としては、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質などの他に、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列と約97～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えばリガンド結合活性、シグナル情報伝達などが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが性質的に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。より具体的には、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質としては、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列を有するヒト由来のCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質などが挙げられる。また、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質としては、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸が消失したアミノ酸配列、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列に1または2個以上のアミノ酸が付加したアミノ酸配列を含有する蛋白質なども挙げられる。さらに具体的には、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質としては、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列を有するヒト由来のCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質などの他に、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1または2
- 20
- 30
- 40
- 50

個以上（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が欠失したもの、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が付加したもの、配列番号：3または配列番号：14で表されるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、2個以上30個以下、より好ましくは2個以上10個以下）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたものなどが挙げられる。さらに、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質には、N末端のMetが保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、GluのN末端側が生体内で切断され、該Gluがピログルタミン化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

【0063】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその塩は、後述するヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質分子のうち、細胞膜の外に露出している部位などが用いられる。具体的には、【図4】または

【図8】で示される本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の疎水性プロット解析において細胞外領域（親水性（Hydrophilic）部位）であると分析された部分を含むペプチドである。また、疎水性（Hydrophobic）部位を一部に含むペプチドも同様に用いることができる。個々のドメインを個別に含むペプチドも用い得るが、複数のドメインを同時に含む部分のペプチドでも良い。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔥酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0064】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の

部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を適當なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチドシンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)
- ②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)
- ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)
- ④矢島治明 および柳原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)
- ⑤矢島治明監修、統医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製単離することができる。上記方法で得られる蛋白質が遊離体である場合は、公知の方法によって適當な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

【0065】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：3または配列番号：14のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ヒトゲノムDNA、ヒトゲノムDNAライブラリー、ヒト組織・細胞由来のcDNA、ヒト組織・細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、組織・細胞よりmRNA画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する。) によって増幅することもできる。RT-PCRは、より具体的には、DNAプライマーとしては、配列番号：4または配列番号：15で表わされる塩基配列（センス配列またはアンチセンス配列）を有する合成DNAなどが用いられる。

【0066】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分塩基配列を有

する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適當なベクターに組み込んだDNAをヒトヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別する。ハイブリダイゼーションの方法は、例えばMolecular Cloning 2nd (ed.; J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。クローニングされたヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適當な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適當な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

【0067】ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC118, pUC119)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19, pSH15)、λファージなどのベクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質のN端末側に付加することもできる。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル

配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイティングファクターα・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

- 【0068】このようにして構築されたヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、たとえばエシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属菌、バチルス属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12・DH1 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクレイック・アシズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], J221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス(Genetics), 39巻, 440(1954)]などが用いられる。バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチルス(Bacillus subtilis) MI114 [ジーン(Gene), 24巻, 255(1983)], 207-213 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)]などが用いられる。酵母としては、たとえばサッカロマイセスセレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイコの幼虫などが用いられる[前田ら、ネイチャー(Nature), 315巻, 592(1985)]。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero細胞、チャイニーズハムスター細胞CHO, DHFR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO(dhfr-CHO細胞), CHO K-1細胞、ヒトFL細胞, 293細胞, L細胞、ミエローマ細胞, C127細胞, Balb/c 3T3細胞, Sp-2/O細胞などが用いられる。
- 【0069】エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69巻, 2110(1972)やジーン(Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・ア

ンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75巻, 1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1988)などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。以上の宿主細胞の中でも、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質DNAを含有する発現プラスミドの宿主細胞としては、特に、動物細胞などが好ましく、例えば293細胞、CHO細胞、Vero細胞、L細胞、ミエローマ細胞、C127細胞、Balb/c3T3細胞、Sp-2/O細胞などが挙げられ、なかでもCHO細胞または293細胞などが好ましく、特にCHO細胞 [ジャーナル・オブ・エクスペリメント・オブ・メディシン (J. Ex. p. Med.)]、108巻, 945(1958)] などが好適である。さらに、CHO細胞のなかでも、dhfr遺伝子が欠損しているCHO細胞 (以下、CHO (dhfr-) 細胞と略称する場合がある) [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77巻, 4216-4220(1980)]、CHO K-1細胞 [プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 60巻, 1275(1968)] などが好ましい。発現プラスミド中に選択マーカーとしてdhfr遺伝子が挿入されている場合は、CHO (dhfr-) 細胞などが好適である。発現プラスミドの動物細胞への導入方法としては、公知の方法、例えばリン酸カルシウム法 [Graham, F. L. and van der Eb, A. J. ヴィロロジー (Virology) 52, 456-467 (1973)]、電気穿孔法 [Neumann, E. et al. エンボ・ジャーナル (EMBO J.) 1, 841-845 (1982)] 等が用いられる。以上のようにしてヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質DNAを含有するベクターで形質転換された形質転換体が得られる。また、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質DNAを含有する発現プラスミドで形質転換された形質転換体は、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を製造することができる。

【0070】ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を高発現できる細胞は、前述の発現プラスミドが染色体に組込まれた細胞をクローニング選択によって選択することによって得ることができる。具体的には、まず、上記の選択マーカーを指標として形質転換体を選択する。さらに、このように選択マーカーを用いて得られた形質転換体に対し

て、繰り返しクローニング選択を行うことによりヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の高発現能を安定に有する細胞株を得ることができる。またdhfr遺伝子を選択マーカーとして用いた場合、メソトレキセート (MTX) の濃度を漸次上げて培養して耐性細胞を選択することにより、導入遺伝子を細胞内で増幅することにより、さらに高発現の細胞株を得ることもできる。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質および本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞は、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質DNAを含有するベクター (特に、発現プラスミド) を含有する形質転換体を、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAの発現が可能な条件下で培養することによっても製造することができる。宿主細胞がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミノ酸を含むM9培地 [ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972] が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえば3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主細胞がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43℃で約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30~40℃で約6~24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバーカホールダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 77巻, 4505(1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーニティスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 81巻, 5330(1984)] が挙げられる。培地のpHは約5~8に調整するのが好ましい。培

養は通常約20°C~35°Cで約24~72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主細胞が昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium [Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788(1962)] に非働化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2~6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27°Cで約3~5日間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約0.5~20%の胎児牛血清を含むEMEM培地 [サイエンス (Science), 122卷, 501(1952)], DMEM培地 [ヴィロロジー (Virology), 8卷, 396(1959)], RPMI 1640培地 [ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199卷, 519(1967)], 199培地 [プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73卷, 1(1950)], α-MEM培地などが用いられる。特に、CHO (d h f r) 細胞およびd h f r 選択マーカー遺伝子を用いる場合、チミジンをほとんど含まない透析ウシ胎児血清を含むDMEM培地を用いるのが好ましい。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30°C~40°Cで約15~72時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌などを加える。このようにして、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクター (特に、発現プラスミド) を保持する形質転換体からヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞を製造することができる。

【0071】上記したヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞の培養物からヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを分離精製するには、例えば下記の方法により行なうことができる。まず、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の粗抽出液を得る方法などが適宜用い得る。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどのたんぱく変性剤や、トリトンX-100 (登録商標。以下、TMと省略することがある。)などの界面活性剤が含まれていてもよい。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティーコロマトグラフィーなどの特異的新和性を利用する方法、逆相高速

液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。かくして得られるヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。なお、組換え体が產生するヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を、精製前または精製後に適當な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えは、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。かくして生成するヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の活性は標識したCRFなどとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

【0072】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞の細胞膜画分は、上記のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことを行う。細胞の破碎方法としては、例えは、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社) による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えは細胞破碎液を低速 (500 rpm ~ 3000 rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 遠心し、上清をさらに高速 (15000 rpm ~ 30000 rpm) で通常30分~2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現したヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞やその細胞膜画分中のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり10<sup>3</sup>~10<sup>6</sup>分子であるのが好ましく、10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドおよびヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAは、①抗体および抗血清の入手、②組換え型レセプター蛋白質の発現系の構築、③同発現系を用いたレセプター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、④構造的に類似したリガンド・レセプターとの比較にもとづいたドラッグデ

ザインの実施、⑤遺伝子診断におけるプローブ、PCRプライマーの作製、⑥遺伝子治療などに用いることができる。特に、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の発現系を用いたレセプター結合アッセイ系によって、温血動物（特に、ヒト）に特異的なCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストをCRFに起因する各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

【0073】以下に、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質部分ペプチド、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAの用途について、具体的に説明する。

(1) CRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法

CRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法においては、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質としてヒトの心臓や筋肉を用いることも考えられる。しかし、ヒト由来の組織は入手が極めて困難であるため、スクリーニングに用いるものとしては適当ではなく、実際には、細胞（特に、CHO細胞などの動物細胞や昆虫細胞）に大量発現させた組換え型ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質が適している。さらには、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を持続的に安定発現している細胞株を用いるのが最も好ましい。したがって、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩、または本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分は、CRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用試薬として有用である。すなわち、本発明は、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩、または本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分を用いることを特徴とするCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

【0074】より具体的には、本発明は、

(I) (i) 本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に、CRFを接触させた場合と (ii) 本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に、CRFおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および

(II) (i) 本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に、CRFを接触させた場合と (ii) 本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に、CRFおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを

特徴とするCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。

具体的には、本発明のスクリーニング方法 (I) および (II) においては、(i) と (ii) の場合における、例えば該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩、またはヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞もしくはその細胞膜画分に対するCRFの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とするものである。

- 10 【0075】より具体的には、本発明は、  
 (I a) (i) 標識したCRFを、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合と、(ii) 標識したCRFおよび試験化合物を、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に接触させた場合における、標識したCRFの該レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法  
 20 (II a) (i) 標識したCRFを、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合と、(ii) 標識したCRFおよび試験化合物を、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合における、標識したCRFの該細胞またはその細胞膜画分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とするヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、および  
 (II b) (i) CRFを、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合と、(ii) CRFおよび試験化合物を、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に接触させた場合における、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、K<sup>+</sup>チャネルの開放、N型Ca<sup>2+</sup>チャネルの閉鎖、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変動、細胞内cAMP生成の促進または抑制、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、細胞の遊走活性、ホルモンの分泌、G蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とするヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法を提供する。  
 30 【0076】上記の(I a) または(II a) のスクリーニング方法において、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質に結合して、CRFとヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物がヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストとして選択できる。さらに、  
 40 上記(II b) のスクリーニング方法において、ヒトCR

$\text{F}_2$ レセプターに結合し、該レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、 $\text{K}^+$ チャンネルの開放、 $\text{N}$ 型  $\text{Ca}^{2+}$ チャ  
ンネルの閉鎖、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変動、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成の促進または抑制、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、細胞の遊走活性、ホルモン分泌、G 蛋白質の活性化、細胞増殖などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物をヒト CRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストとして選択することができる。一方、上記の (I a) または (II a) のスクリーニング方法において、CRF とヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する活性が認められた試験化合物の中で、該細胞刺激活性を有しない化合物をヒト CRF<sub>2</sub>レセプターアンタゴニストとして選択することができる。本発明のヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードする cDNA およびヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞が得られる以前は、ヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を高発現できる細胞がなかったため、ヒト CRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを効率よくスクリーニングすることができなかつた。

【0077】本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。リガンドとして使用する CRF としては、市販のものなどを用いることができる。また、CRF の代わりに、公知の CRF レセプターアゴニストやアンタゴニストなどを使用することもできる。例えば、ソイベジンやウロテンシン I などを使用することができる。標識した CRF としては、例えば、[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C] などで標識した CRFなどを用いることができ、さらには、[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C] などで標識した公知の CRF アゴニストやアンタゴニストなどを用いることもできる。例えば、[<sup>125</sup>I] で標識されたヒツジ CRF (NEN Research Products社、NEX-217) やヒト CRF (NEN Research Products社、NEX-216) などが好適である。試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

【0078】具体的には、上記の (I a) または (II a) のスクリーニング方法を実施するには、まず、本発明のヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分、あるいはヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを、スクリーニングに適した反応バッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。反応バッファーには、pH 約 4～10（望ましくは、pH 約 6～8）のリン酸バッファー、トリス一塩酸バッファーなどの、CRF とレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、T

w e e n - 8 0™ (花王一アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることができる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的で、PMS F、ロイペプチド、バシリラシン、アプロチニン、E-64 (ペプチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。さらに、蛋白質成分として、約 0.01～5% (好ましくは、0.1～1%) の BSA、約 0.01～5% (好ましくは、0.05～0.5%) のゼラチンなどを加えることができる。従来、CRF は 41 個のアミノ酸からなる比較的大きいペプチドであるため、リガンド結合実験の際の反応容器やピペットなどに吸着しやすく、正確で感度の高い測定は容易ではなかった。そこで、本発明の上記 (I a) および (II a) のスクリーニング方法において、CRF の特異的結合量を測定するための反応条件としては、本発明のヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質またはその部分ペプチド、あるいは本発明のヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞またはその細胞膜画分に CRF を接触させ、反応バッファーの組成、反応時間、反応温度などをそれぞれ適切に設定することが望ましい。

【0079】反応バッファーの組成中に非特異的結合を低減させる目的で、界面活性剤や蛋白質を添加することが効果的で、特に界面活性剤としては、例えば約 0.01～0.05% の CHAPS、約 0.05% のジギトニンを添加することが望ましい。また、蛋白質成分としては、例えば、約 0.2% の BSA または約 0.3% のゼラチンを添加することが望ましい。また、反応温度と反応時間としては、それぞれ約 25°C、約 2 時間であることが望ましい。一方、上記スクリーニング方法にヒト CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する CHO 細胞を用いる場合、培養器に付着させたまま、つまり CHO 細胞を生育させた状態で、あるいはグルタルアルデヒドやパラホルムアルデヒドで固定化した細胞を用いて、CRF と CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を結合させることができる。この場合、該反応バッファーとしては、例えば培地やハンクス液などが用いられる。そして、0.01 ml～1.0 ml の該レセプター溶液に、一定量（例えば、2200 Ci/mmol の場合、約 10000 cpm～100000 cpm）の標識した CRF（例えば、[<sup>125</sup>I] CRF）を添加し、同時に  $10^{-4}\text{M}$ ～ $10^{-10}\text{M}$  の試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識の CRF を加えた反応チューブも用意する。反応は 0°C から 50°C、望ましくは 4°C から 37°C で 20 分から 24 時間、望ましくは 30 分から 3 時間行なう。反応後、ガラス纖維滤紙等で滤過し、適量の洗浄用バッファーで洗浄した後、ガラス纖維滤紙に残存する放射活性（例えば、[<sup>125</sup>I] の量）を液体シンチレーションカウンターまたは γ カウンターで測定する。滤過には、マニホールドやセルハーベスターを用い

ることができるが、セルハーベスターを用いることが大量の試験化合物を処理するためには望ましい。拮抗する物質がない場合のカウント(B<sub>0</sub>)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント(B<sub>0</sub>-NSB)を100%とした時、試験化合物を入れた時の特異的結合量(B-NSB)が、例えばカウント(B<sub>0</sub>-NSB)の50%以下になる試験化合物をアゴニストまたはアンタゴニスト候補化合物として選択することができる。

**【0080】**また、上記(IIb)のスクリーニング方法を実施するためには、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変動、細胞内cAMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos活性化、pHの低下、ホルモンの放出、細胞の遊走活性などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有するCHO細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、cAMPやアラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってよい。

**【0081】**本発明のスクリーニング用キットは、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有するCHO細胞またはその細胞膜画分、あるいは本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはその塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

#### [スクリーニング用試薬]

##### ①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン（シグマ社製）を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

##### ②ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質標品

ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有するCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、95%airで2日間培養したもの。

##### ③標識CRF

市販の[<sup>3</sup>H]、[<sup>125</sup>I]、[<sup>14</sup>C]、[<sup>35</sup>S]などで標識したCRF

溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて5nMに希釈する。

##### ④CRF標準液

CRFを0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで0.1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

#### 【0082】 [測定法]

①12穴組織培養用プレートにて培養したヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有するCHO細胞を、測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490μlの測定用緩衝液を各穴に加える。

②10<sup>-3</sup>～10<sup>-10</sup>Mの試験化合物溶液を5μl加えた

10 後、5nM標識CRFを5μl加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るために試験化合物のかわりに10<sup>-4</sup>MのCRFを5μl加えておく。

③反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識CRFを0.5mlの0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式〔数2〕で求める。なお、

20 [<sup>125</sup>I]で標識されている場合は、液体シンチレーターと混合することなしに直接ガンマカウンターで測定できる。

#### 【0083】

##### 【数2】

$$\text{PMB} = [(B - NSB) / (B_0 - NSB)] \times 100$$

#### 【0084】 PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specific Binding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

30 本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、CRFと本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物であり、具体的には、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターを介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニスト）、あるいは該細胞刺激活性を有しない化合物またはその塩（いわゆる、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアンタゴニスト）である。

40 **【0085】**ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストは、CRFが有する生理活性の全部または一部を有しているので、該生理活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、痴呆症、肥満症の予防・治療剤として有用である他、例えば、ストレスに対する適応促進剤、ACTH、β-エンドルフィン、β-リポトロビンもしくはα-MSFの分泌促進剤、血圧降下剤、気分や行動の調節剤、胃腸機能の調節剤、自律神経系の調節剤、下垂体、心血管系、消化管もしくは中枢神経の機能検査薬などとして有用である。一方、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアンタゴニストは、CRFが有する生理活性の全部または一部を抑制することができるので、該生理活性

を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、ストレスからくる鬱病・不安・頭痛、炎症性疾患、免疫抑制、AIDS、アルツハイマー病、胃腸障害、食欲不振、出血性ストレス、薬物・アルコール等の禁断症状、薬物依存症、生殖障害、クッシング病、低血圧症の予防・治療剤などとして有用である。さらに、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られた該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターagonistまたはアンタゴニストの構造式を化学修飾あるいは置換したもの、また、該化合物の構造式を基にデザイン化した化合物なども、本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られたヒトCRF<sub>2</sub>レセプターagonistまたはアンタゴニストに含まれる。該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターagonistまたはアンタゴニストの塩としては、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機塩（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、亜酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

【0086】本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られるアゴニストまたはアンタゴニストを上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従つて低毒性で安全に使用することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスター、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。

【0087】注射用の水溶液としては、例えば生理食塩

水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール（たとえばエタノール）、ポリアルコール（たとえばプロピレンギリコール、ポリエチレンギリコール）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80(TM)、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレンギリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど、特にヒト）に対して投与することができる。該化合物またはその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。

#### 【0088】(2) CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤

本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAは、CRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質欠乏症の予防・治療剤として使用することができる。例えば、生体内において本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質が減少しているためにCRFの生理作用が期待できない患者がいる場合に、(イ)本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し、生体内で該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を発現させることによって、あるいは(ロ)細胞に本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAを挿入し、該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、該患者のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の量を増加させ、CRFの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAは、安全で低毒性なCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質欠乏症（例えば、高血圧、

自律神経失調症またはストレスなど)の予防・治療剤などとして用いることができる。本発明のDNAを上記の予防・治療剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスゾシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のDNAを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0089】錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスター、ゼラチン、アルギン酸などの膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチエリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などの天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にしたがって処方することができる。注射用の水性液としては生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液(例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど)などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール(たとえばエタノール)、ポリアルコール(たとえばプロピレンジコール、ポリエチレンジコール)、非イオン性界面活性剤(たとえばポリソルベート80(TM)、HCO-50)などと併用してもよい。油性液としてはゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(たとえば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液)、無痛化剤(たとえば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(たとえば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレンジコールなど)、保存剤(たとえば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。このようにして得られる製剤は安全で低毒性があるので、例えば温血哺乳動物(たとえば、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど、特

にヒト)に対して投与することができる。該DNAの投与量は、症状などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによって異なるが、たとえば注射剤の形では通常成人(60kgとして)においては、一日につき約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当たりに換算した量を投与することができる。また、本発明のDNAを細胞に挿入し、該ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を発現させ、該細胞を患者に移植する方法は、それ自体公知の方法あるいはそれに準じる方法を用いることができる。

#### 【0090】(3) CRFの定量法

本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドまたはその塩は、CRFに対して結合性を有しているので、生体内におけるCRF濃度を感度良く定量する際の試薬として用いることができる。すなわち、本発明は、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩、または本発明の部分ペプチドまたはその塩と、被検体とを接触させることを特徴とする被検体中のCRF濃度の定量法を提供する。本発明の定量法は、例えば競合法と組み合わせることによって用いることができる。具体的には、たとえば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

さらに、本発明のCRFの定量法は、CRF濃度の増減に起因する疾病(たとえば、ストレス、炎症、アルツハイマー病、胃腸障害など)の診断方法としても使用できる。

【0091】(4) 本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体または抗血清の製造

本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩に対する抗体(たとえば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体)または抗血清は、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

50 50 50

例えば、モノクローナル抗体は、後述の方法に従って製造することができる。

**【0092】 [モノクローナル抗体の作製]**

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質もしくはその塩または本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の部分ペプチドもしくはその塩（以下、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターと略称する場合がある）は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、たとえばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、たとえばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、たとえばケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレンギリコール（PEG）やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。骨髓腫細胞としてはたとえばNS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などがあげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、たとえばヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合した抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したヒトCRF<sub>2</sub>レセプターを加え、固相に

結合した抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターモノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノブテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なわれる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含む RPMI 1640 培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT 培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日本製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なわれる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体価の測定と同様にして測定できる。

**【0093】 (b) モノクローナル抗体の精製**

抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターモノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換法（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行われる。以上の（1）および（2）の方法に従って製造させる本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体は、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターを特異的に認識することができるので、被検液中のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、（i）本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターに反応する抗体と、被検液および標識化ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの定量法、（ii）被検液と担体上に不溶化した抗体および標識化された抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの定量法において、一方の抗体がヒトCRF<sub>2</sub>レセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体がヒトCRF<sub>2</sub>レセプターのC端部に反応する抗体であることを特徴とする被検液中のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの定量法を提供する。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターを認識するモノクローナル抗体（以下、抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体と称する場合がある）を用いてヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよ

く、また、抗体分子の  $F(ab') 、  $Fab'$  、あるいは  $Fab$  画分を用いてもよい。本発明の抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えばヒトCRF<sub>2</sub>レセプター量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。$

【0094】標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが挙げられる。放射性同位元素としては、例えば [<sup>125</sup>I] 、 [<sup>131</sup>I] 、 [<sup>3</sup>H] 、 [<sup>14</sup>C] などが、上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば  $\beta$ -ガラクトシダーゼ、  $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リソング酸脱水素酵素等が、蛍光物質としては、フルオレスカミン、フルオレッセンインチオシアネートなどが、発光物質としては、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどがそれぞれ挙げられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチンアビジン系を用いることもできる。抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が挙げられる。サンドイッチ法においては不溶化した抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体に被検液を反応させ（1次反応）、さらに標識化抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体を反応させ（2次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター量を定量することができる。1次反応と2次反応は逆の順序に行っても、また、同時になってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

【0095】本発明のサンドイッチ法によるヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる抗ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体はヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、ヒ

トCRF<sub>2</sub>レセプターのC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と（F）と抗体と結合した標識抗原（B）とを分離し（B/F分離）、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体などを用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用い第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

【0096】これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えてヒトCRF<sub>2</sub>レセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和49年発行）、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和54年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和53年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第2版）（医学書院、昭和57年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第3版）（医学書院、昭和62年発行）〕。

〔Methods in ENZYMOLOGY〕 Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))（以上、アカデミックプレス社発行）など参照〕。

以上のように、本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター抗体を用いることによって、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターを感度良く定量することができる。

【0097】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン
T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャー リボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
EIA	: エンザイムイムノアッセイ
Gly	: グリシン
Ala	: アラニン
Val	: バリン
Leu	: ロイシン
Ile	: イソロイシン
Ser	: セリン
Thr	: スレオニン
Cys	: システイン
Met	: メチオニン
Glu	: グルタミン酸
Asp	: アスパラギン酸
Lys	: リジン
Arg	: アルギニン
His	: ヒスチジン
Phe	: フェニルアラニン
Tyr	: チロシン
Trp	: トリプトファン
Pro	: プロリン
Asn	: アスパラギン
Gln	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Me	: メチル基
Et	: エチル基
Bu	: プチル基

P h : フェニル基  
T C : チアゾリジン-4(R)-カルボキサミド基

【0098】本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：1〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

10 〔配列番号：2〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：3〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：4〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNA断片の塩基配列を示す。

〔配列番号：5〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

20 〔配列番号：6〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：7〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：8〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

30 〔配列番号：9〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：10〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：11〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：12〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

40 〔配列番号：13〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするcDNAのクローニングに使用した合成DNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：14〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：15〕本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の全長をコードするcDNA断片の塩基配列を示す。

後述の実施例4で得られた形質転換体エシエリヒアコリ (Escherichia coli) JM109/phs-AH1

50 は、平成7年6月15日から通商産業省工業技術院生命

工学工業技術研究所（N I B H）に寄託番号 F E R M B P - 5 1 3 6 として寄託されており、また平成7年6月12日から財団法人発酵研究所（I F O）に I F O 1 5 8 2 7 として寄託されている。また、後述の実施例6で得られた形質転換体エシェリヒア コリ（Escherichia coli）JM109/pCRF2-10は、平成7年9月5日から通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（N I B H）に寄託番号 F E R M B P - 5 2 2 6 として寄託されており、また平成7年8月29日から財団法人発酵研究所（I F O）に I F O 1 5 8 6 8 として寄託されている。

## 【0099】

【実施例】以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを増幅させるための合成DNAプライマーの製造

公知のヒトカルシトニンレセプター（X 8 2 4 6 6）、ヒトパラチロイドホルモンレセプター（X 6 8 5 9 6）、ヒトグルカゴンレセプター（U 0 3 4 6 9）、ヒトグルカゴン-ライクポリペプチド-1レセプター（U 0 1 1 5 6）、ラットセクレチンレセプター（X 5 9 1 3 2）、ヒトグロースホルモン放出ホルモンレセプター（L 0 1 4 0 6）、ヒトピュイタリーアデニレートサイクレース-アクティベートポリペプチドレセプター（D 1 7 5 1 6）、ラットピュイタリーアデニレートサイクレース-アクティベートポリペプチドレセプター（Z 2 3 2 7 9）、ヒトパソアクティブインテスティナルペプチドレセプター（X 7 5 2 9 9）、ヒトビップ2レセプター（L 3 6 5 6 6）、ヒトコルチコトロピン放出ファクターレセプター（L 2 3 3 3 2）、およびラットコルチコトロピン放出ファクター2レセプター（U 1 6 2 5 3）の第3および第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするc DNAの塩基配列をそれぞれ比較し、それぞれの領域で類似性の高い部分を見いだした

【図1および図2】上記の（ ）内の略語はDNASIS Gene/Proteinシークエンスデータベース（CD019、日立ソフトウェアエンジニアリング）を用いてGenBank/EMBL Data Bankを検索した際に示される整理番号であり、通常Accession numberと呼ばれるものである。特に、多くのレセプター蛋白質をコードするc DNAで一致する塩基部分を基準とし、その他の部分においてもなるべく多くのレセプターc DNAと配列の一貫性を高めるために混合塩基の導入を計画した。この配列をもとに、共通する塩基配列に相補的である配列番号：1または配列番号：2で表わされる塩基配列を有する合成DNA 2本を作製した。

5'-CATTAYTKGATSGYGRCCAACT  
WCWNCTGG-3'

[YはTまたはCを示し、KはGまたはTを示し、SはCまたはGを示し、RはAまたはGを示し、WはAまたはTを示し、NはIを示す。]（配列番号：1）

5'-G T A G A R R A Y A G C C A C M A M R A R N  
C C C T G R A A - 3'

[RはAまたはGを示し、YはTまたはCを示し、MはAまたはCを示し、NはIを示す。]（配列番号：2）

Y、K、S、R、WおよびMは、合成時に複数の塩基に混合して合成する。

## 10 【0100】

【実施例2】ヒト胃由来poly(A)+RNA画分からのc DNAの合成

ヒト胃poly(A)+RNA画分（クロントック社、カタログ番号6548-1）5 μgにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー（B R L社）を加え、モロニイマウス白血病ウイルスの逆転写酵素（B R L社）により、添付バッファーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はエタノール沈殿を行なった後、30 μlのT Eに溶解した。

## 20 【0101】

【実施例3】ヒト胃由来c DNAを用いたPCR法による受容体c DNAの増幅

実施例2でヒト胃より調製したc DNA 1 μlを錠型として使用し、実施例1で合成したDNAプライマーを用いてPCRによる増幅を行なった。反応液の組成は、合成DNAプライマー（配列：5'プライマー配列および3'プライマー配列）各100 pM、0.25 mM d NTPs (Deoxyribonucleoside triphosphate)、Taq

DNA polymerase 1 μlおよび酵素に付属のバッファー10 μlで、総反応溶液量は100 μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキン・エルマー社）を用い、96°C・30秒、45°C・1分、60°C・3分のサイクルを25回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムプロミド染色によって行なった。

## 【0102】

【実施例4】PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入c DNA部分の塩基配列の解読によるヒトCRF<sub>2</sub>レセプター候補クローニングの選択

実施例3で行なったPCR後の反応産物は1.5%のアガロースゲルを用いて分離し、バンドの部分をカミソリで切り出した後、エレクトロエリューション、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。T Aクローニングキット（インビトロゲン社）の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR<sup>TM</sup>IIへサブクローニングした。これを大腸菌JM109 competent cell（宝酒造株式会社）に導入して形質転換したのち、c DNA挿入断片を持つクローニングをアンピシリン、IPTG(isopropylthio-β-D-galactoside)およびX-gal(5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galacto-

side)を含むLB寒天培地中で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌した爪楊枝を用いて分離し、形質転換体を100クローン得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し、自動プラスミド抽出装置PI-100(クラボウ)を用いてプラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてEcoRIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。残りのDNAの一部をさらにRNase処理、フェノール・クロロフォルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応は DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (ABI社)を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した。得られた塩基配列を基に、DNASIS(日立システムエンジニアリング社)を用いてホモロジー検索を行なった結果、形質転換体エシェリヒアコリ(Escherichia coli) JM109/phs-AH1の保有するプラスミドに挿入されたcDNA断片が新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードすることが分かった。該cDNA断片の塩基配列を【図3】に示した。さらに確認するために、DNASIS(日立システムエンジニアリング社)を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した後【図3】、疎水性プロット【図4】を行なった結果、G蛋白質共役型レセプター蛋白質であることを示す疎水性ドメインが存在することが確認された。また、アミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行なった結果、ラット\*

N0 5'-ATGAAGAGGAAGAGGGCACTTGCAGCA-3'

(配列番号: 5)

N1 5'-CAGTGGAGTAGGTCAATGACAATGGC-3'

(配列番号: 6)

次にヒト胃 poly(A)'RNA画分 1 μgを用いて Marathon cDNA amplification キットの方法に従って、錠型に用いるための二本鎖cDNAを合成した。続いてこれを材料にして1回目のPCRを行った。反応液の組成は、二本鎖cDNA 5 μl、合成DNAプライマー(N0およびキットに付属しているAP1)各200nM、200 μM dNTP、ExTaq DNA polymerase(宝酒造)0.5 μl、および10×ExTaq用反応バッファー5 μlで、総反応液量は水を加えて50 μlとした。増幅のための反応はサーマルサイクル(パーキン・エルマー社)を用い、94°C・30秒、60°C・30秒、68°C・3分のサイクルを30回繰り返した。次に該反応液0.1 μlを錠型にして2回目のPCRを行った。反応液の組成は、合成プライマー(N1およびキットに付属しているAP2)各200nM、200 μM dNTP、ExTaq DNA polymerase 0.5 μl、10×ExTaq用反応バッファー5 μlで、総反応液量は水を加えて50 μlとした。反応条件は94°C・30秒、68°C・3分を25回繰り返した。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムプロミド染色によって行った。

特異的に増幅されてきた約350 bpの長さのDNA断片をエレクトロエリューションでゲルから回収した。これを実施例4に記載の方法でプラスミドベクターpCR IIへクローニング後、塩基配列を決定した。その結果、回収したDNA断片は、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターcDNA断片のプライマーN1の位置から5'側に向かって約350 bpを含んでいることが判明した。以上の操作で得られたヒトCRF<sub>2</sub>レセプター cDNAの塩基配列の情報を基に、さらに5'および3'側のDNA断片の増幅を行った。5'側DNA断片の増幅用には5'-AmpliFINDER RACE Kit(クローンテック社、カタログ番号 K1800-1)を用いて以下のように行った。5'側を増幅させるためのプライマーとして新たに配列番号: 7または配列番号: 8で表される塩基配列を有する合成DNA 2本を作製した。

N11 5'-ATGATGGGGCCTTGGTAGATGTAGTCCA

(配列番号: 7)

N12 5'-GCTCCTTGCCAAACCAAGCAGCACTGTTCAATT

C T - 3'

次にヒト胃 poly(A)'RNA画分 2 μgを用いて5'-AmpliFINDER RACE Kitの方法に従ってc DNA合成およびPCRを行った。c DNA合成の際のプライマーとしてN11を用いた。また1回目のPCRには、プライマーとしてN12およびキットに付属しているアンカープライマーを使用し、2回目のPCRには先に合成したN0およびアンカープライマーを使用した。PCR反応の組成は、合成プライマー各200nM、200μM dNTP、ExTaq DNA polymerase 0.5 μl、10×ExTaq用反応バッファー 5 μlで、総反応液量は水を加えて50 μlとした。1回目のPCRは、94°C・45秒、55°C・45秒、68°C・3分を30回繰り返した。また2回目のPCRは、94°C・45秒、60°C・45秒、68°C・3分を25回繰り返した。増幅産物を\*

C1 5'-GAGGACGACCTGTCACAGATCATGT-3'

(配列番号: 9)

C11 5'-ATT CGCT GTCT GCGGAAT GTGATT CACT

GG-3'

C12 5'-CTGGAACCTCATCACCA CCTTTATCCTG

(配列番号: 10)

CG-3'

(配列番号: 11)

次にヒト胃 poly(A)'RNA画分 1 μgを用いて3' RACE Systemの方法に従ってc DNAを合成した後、1回目のPCRをC11およびキットに付属のアンカープライマーを用いて行った。反応液の組成および反応条件は、前述の5'側DNA断片の増幅と同様の方法で行った。次に2回目のPCRをプライマーにC12およびアンカープライマーを用いて同様に行い、3回目のPCRをプライマーにC1およびアンカープライマーを用いて同様に行つた。増幅産物を1.5%アガロースゲル電気泳動で確認した結果、約1200 bpのDNA断片が増幅されていたので、該DNA断片を上記の方法で塩基配列を解析した。その結果、回収したDNA断片は、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターc DNA断片のプライマーC1の位置から3'方向約1200 bpを含んでいることが判明した。以上の操作で配列番号: 15で表されるヒトCRF<sub>2</sub>レセプターc DNAの全コード領域を取得した。

C2-F 5'-GTCGACACGCGGCTGCGGGACGCGATG

(配列番号: 12)

GA-3'

C2-R 5'-GTCGACTGTGCAGGTGGCGACCGAGG

(配列番号: 13)

C2-Fは、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターc DNAのスタートコドンを含む-18～+5（スタートコドンATGのAを+1とする）に対応するセンス配列で、C2-Rは、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターc DNAのストップコドンを含む+1258～+1283に対応するアンチセンス配列である。また、両方のプライマーには5'末端に制限酵素部位(Sal I)を付加した。PCR反応液の組成は、ヒト胃c DNA 1 μl、合成DNAプライマー(C2-FおよびC2-R)各200nM、200μM

\* 1.5%アガロースゲル電気泳動で確認した結果、約700 bpのDNA断片が増幅されていたので、該DNA断片をエレクトロエリューションでゲルから回収し、実施例4に記載の方法でプラスミドベクターpCRIIへクローニングし、塩基配列を決定した。その結果、回収したDNA断片は、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターc DNA断片のプライマーN0の位置から、5'側方向約700 bpを含んでいることが判明した。3'側DNA断片の増幅用には3' RACE System (GIBCO BRL: カタログ番号 8373SA) を用いて以下のように行った。3'側を増幅させるためのプライマーとして新たに配列番号: 9、配列番号: 10、または配列番号: 11で表される塩基配列を有する合成DNA 3本を作製した。

※ F<sub>2</sub>レセプターc DNAの全コード領域を取得した。これにより、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターc DNAの全コード領域の塩基配列が判明し、配列番号: 14で表されるヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の全アミノ酸配列がはじめて明らかになった〔図6および図7〕。

【0104】

【実施例6】PCR法によるヒトCRF<sub>2</sub>レセプターc

DNAの全コード領域を含むDNA断片の増幅  
実施例2で調製したヒト胃c DNAを鋳型としてヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の全長をコードするc DNA断片の増幅を行つた。まず、実施例5で判明したヒトCRF<sub>2</sub>レセプターc DNAの配列を基に、配列番号: 12または配列番号: 13で表される塩基配列を有する合成DNA 2本を作製した。

dNTP、ExTaq DNA polymerase 0.5 μl、および10×ExTaq用反応バッファー 5 μlで、総反応液量は水を加えて50 μlとした。反応条件は、95°C・30秒、70°C・4分を35回繰り返した。反応液を1%アガロースゲル電気泳動で確認した結果、目的とする大きさ(約1.3 kb)のDNA断片が特異的に増幅されていた。該DNA断片をエレクトロエリューションでゲルから回収し、前記の方法でプラスミドベクターpCR IIへクローニング後、自動塩基配列解析装置370A

(アプライドバイオシステム社)で挿入DNA断片の塩基配列を解析した。その結果、該DNA断片は、実施例5で判明したヒトCRF<sub>2</sub>レセプターcDNAの全コード領域を含有するDNA断片であることが確認された。ここで得られた複数のクローンの中でpCRF2-10を以後の実験に使用することとした。pCRF2-10はヒトCRF<sub>2</sub>レセプターcDNAの全コード領域が制限酵素SaiIまたはEcoRIで切り出すことができるため、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター発現プラスミドの構築、DNAプローブの調製等に好適である。

## 【0105】

【発明の効果】本発明の配列番号：1または配列番号：2で表される塩基配列と実質的に同一の塩基配列を有することを特徴とするDNAを用いることによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを効率よく増幅することができる。これによって、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを効率よくスクリーニングし、クローニングを行うことができる。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質は、公知のヒトCRFレセプター蛋白質のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有する新規な蛋白質である。本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質をコードするDNAおよび該DNAにコードされるヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質、その部分ペプチドまたはヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質を含有する細胞もしくはその細胞膜画分は、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプターアゴニストまたはアンタゴニストを効率よくスクリーニングすることができる。上記のスクリーニング方法によれば、アゴニストまたはアンタゴニストを有利に選択することができるので、医薬品を早期に開発することができる。アゴニストは、例えば痴呆症、肥満症の予防・治療剤、ストレスに対する適応促進剤、ACTH、β-エンドルフィン、β-リポトロピンもしくはα-MSFの分泌促進剤、血圧降下剤、気分や行動の調節剤、胃腸機能の調節剤、自律神経系の調節剤、さらには\*

## 配列

Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr			
1	5	10	15
Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys Cys Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys			
20	25	30	
Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr			
35	40	45	
Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp			
50	55	60	
Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val			
65	70	75	80
Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser			
85	90	95	
Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu			
100	105	110	
Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn			

\* 下垂体、心血管系、消化管もしくは中枢神経の機能検査薬などとして有用である。一方、アンタゴニストは、例えば、ストレスからくる鬱病・不安・頭痛、炎症性疾患、免疫抑制、AIDS、アルツハイマー病、胃腸障害、食欲不振、出血性ストレス、さらには薬物・アルコールの禁断症状、薬物依存症、生殖障害、クッシング病または低血圧症の予防・治療剤などとして有用である。

## 【0106】

## 【配列表】

- 10 【配列番号：1】  
配列の長さ：30  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成DNA  
配列の特徴：NはIを示す。  
配列  
CATTAYTKGA TSGYGRCCAA CTWCWNCTGG 30
- 20 【配列番号：2】  
配列の長さ：30  
配列の型：核酸  
鎖の数：一本鎖  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：他の核酸 合成DNA  
配列の特徴：NはIを示す。  
配列  
GTAGARRAYA GCCACMAMRA RNCCCTGRAA 30
- 30 【配列番号：3】  
配列の長さ：148  
配列の型：アミノ酸  
トポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

73		(38)
115	120	74
Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser		
130	135	140
Phe Leu Gln Ser		
145		

## 【0109】

【配列番号：4】

配列の長さ：444

配列の型：核酸

\* 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

\* 特徴を決定した方法：S

## 配列

ATGTTTGTGG AAGGCTGCTA CCTGCACACG GCCATTGTCA TGACCTACTC CACTGAGCGC	60
CTTCGCAAGT GCCTCTTCCT CTTCATCGGA TGGTGCATCC CCTTCCCCAT CATCGTCGCC	120
TGGGCCATCG GCAAGCTCTA CTATGAGAAC GAACAGTGCT GGTTTGGCAA GGAGCCTGGC	180
GACCTGGTGG ACTACATCTA CCAAGGCCCC ATCATTCTCG TGCTCCTGAT CAATTTGTA	240
TTTCTGTTCA ACATCGTCAG GATCCTAAATG ACAAAAGTTAC GCGCGTCCAC CACATCCGAG	300
ACAATCCAGT ACAGGAAGGC AGTGAAGGCC ACCCTGGTGC TCCTGCCCCT CCTGGGCATC	360
ACCTACATGC TCTTCTTCGT CAATCCCCGG GAGGACGACC TGTCACAGAT CATGTTCATC	420
TATTTCAACT CCTTCCTGCA GTCG	444

## 【0110】

【配列番号：5】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

ATGAAGAGGA AGAGGCAC TT GCG	
CA	25

## 【0111】

【配列番号：6】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

CAGTGGAGTA GGTCATGACA ATG	
GC	25

## 【0112】

【配列番号：7】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

ATGATGGGGC CTTGGTAGAT GTAGTCCACC	30
----------------------------------	----

## 【0113】

【配列番号：8】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

20 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

GCTCCTTGCC AAACCAAGCAC TGT	
TCATTCT	30

## 【0114】

【配列番号：9】

配列の長さ：25

配列の型：核酸

30 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

GAGGACGACC TGTACAGAT CAT	
GT	25

## 【0115】

【配列番号：10】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

40 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

## 配列

ATTCGCTGTC TGCGGAATGT GATTCACTGG	30
----------------------------------	----

## 【0116】

【配列番号：11】

配列の長さ：30

配列の型：核酸

50 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

75

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

CTGGAACCTC ATCACCACTT TTA  
TCCTGCG 30

【0117】

【配列番号：12】

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCGACACGC GGCTGCGGGA CGC  
GATGGA 29

【0118】

配列

Met Asp Ala Ala Leu Leu His Ser Leu Leu Glu Ala Asn Cys Ser Leu

1 5 10 15

Ala Leu Ala Glu Glu Leu Leu Leu Asp Gly Trp Gly Pro Pro Leu Asp

20 25 30

Pro Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly

35 40 45

Thr Cys Trp Pro Arg Ser Ala Ala Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys

50 55 60

Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Val Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr

65 70 75 80

Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Lys Ile Asn Tyr Ser

85 90 95

Gln Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His

100 105 110

Tyr Arg Ile Ala Leu Val Val Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val

115 120 125

Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Ala Leu Arg Ser Ile

130 135 140

Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile

145 150 155 160

Leu Arg Asn Val Met Trp Phe Leu Leu Gln Leu Val Asp His Glu Val

165 170 175

His Glu Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn

180 185 190

Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr

195 200 205

Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys

210 215 220

Cys Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val

225 230 235 240

Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe

245 250 255

Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile

260 265 270

76

\* 【配列番号：13】

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GTCGACTGTG CAGGTGGCG ACCGAGGGT CA 32

【0119】

10 【配列番号：14】

配列の長さ：411

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

\*

77

78

Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg  
 275 280 285  
 Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln  
 290 295 300  
 Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly  
 305 310 315 320  
 Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser  
 325 330 335  
 Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly  
 340 345 350  
 Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser  
 355 360 365  
 Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg  
 370 375 380  
 Val Pro Met Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile  
 385 390 395 400  
 Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val  
 405 410

## 【0120】

【配列番号：15】

配列の長さ：1277

配列の型：核酸

\* 鎖の数：二本鎖

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

\* 特徴を決定した方法：S

## 配列

ACCGGGCTGC GGGACGCGAT GGACGCGCA CTGCTCCACA GCCTGCTGGA GGCCAACTGC 60  
 AGCCTGGCGC TGGCTGAAGA GCTGCTCTTG GACGGCTGGG GGCCACCCCT GGACCCCGAG 120  
 GGTCCCTACT CCTACTGCCA CACGACCTTG GACCAGATCG GAACGTGCTG GCCCCGAGC 180  
 GCTGCCGGAG CCCTCGTGGG GAGGCCGTGC CCCGAGTACT TCAACGGCGT CAAGTACAAC 240  
 ACCACCCGGA ATGCCTATCG AGAATGCTTG GAGAATGGGA CGTGGGCCTC AAAGATCAAC 300  
 TACTCACAGT GTGAGCCCATT TTGGATGAC AAGCAGAGGA AGTATGACCT GCACTACCGC 360  
 ATCGCCCTTG TCGTCACTA CCTGGGCCAC TCGTGTATCTG TGGCAGCCCT GGTGGCCGCC 420  
 TTCTGCTTT TCCTGGCCCT CGCGAGCATT CGCTGCTGC GGAATGTGAT TCACTGGAAC 480  
 CTCATCACCA CCTTTATCCT GCGAAATGTC ATGTGGTTC TGCTGCAGCT CGTTGACCAT 540  
 GAAGTGCACG AGAGCAATGA GGTCTGGTGC CGCTGCATCA CCACCATCTT CAACTACTTC 600  
 GTGGTGACCA ACTTCTCTG GATGTTGTG GAAGGCTGCT ACCTGCACAC GGCCATTGTC 660  
 ATGACCTACT CCACTGAGCG CCTGCGCAAG TGCCTCTTC TCTTCATCGG ATGGTGCATC 720  
 CCCTTCCCCA TCATCGTCGC CTGGGCCATC GGCAAGCTCT ACTATGAGAA TGAACAGTGC 780  
 TGGTTGGCA AGGAGCCTGG CGACCTGGTG GACTACATCT ACCAAGGCC CATCATTCTC 840  
 GTGCTCCCTGA TCAATTTCGT ATTCTGTTTC AACATCGTCA GGATCCTAAT GACAAAGTTA 900  
 CGCGCGTCCA CCACATCCGA GACAATCCAG TACAGGAAGG CAGTGAAGGC CACCCCTGGTG 960  
 CTCTGCCCTC TCCTGGGCAT CACCTACATG CTCTTCTCG TCAATCCCGG GGAGGACGAC 1020  
 CTGTCACAGA TCATGTTCAT CTATTCACAC TCCTTCCCTGC AGTCGTTCCA GGGTTTCTTC 1080  
 GTGTCTGTCT TCTACTGCTT CTTCAATGGA GAGGTGCGCT CAGGGCTGAG GAAGAGGTGG 1140  
 CACCGCTGGC AGGACCATCA CTCCCTTCGA GTCCCCATGG CCCGGGCCAT GTCCATCCCT 1200  
 ACATCACCCA CACGGATCAG CTTCCACAGC ATCAAGCAGA CGGGCGCTGT GTGACCCCTC 1260  
 GGTCGCCAC CTGCACA 1277

## 【0121】

## 【図面の簡単な説明】

【図1】配列番号：1で表される塩基配列を有する5'側の合成DNAプライマー(TM3-C)の配列と、他のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDN 50

Aあるいは遺伝子の塩基配列との共通性を示した図である。

【図2】配列番号：2で表される塩基配列を有する3'側の合成DNAプライマー(TM7-D)に相補的な塩基配列と、他のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコード

ドする cDNA あるいは遺伝子の塩基配列との共通性を示した図である。

【図3】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターcDNA断片の塩基配列およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。塩基配列の5'端および3'端に示した下線部分は、PCR増幅に用いた合成プライマーに相当する。

【図4】図3に示したアミノ酸配列をもとに作成した、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質cDNA断片にコードされる蛋白質の疎水性プロットを示す。この図からTM3～TM7で示す疎水性ドメインの存在が明らかである。

【図5】図3に示したヒトCRF<sub>2</sub>レセプターcDNA断片にコードされる蛋白質の部分アミノ酸配列(phs-AH1)を、公知のラットCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質(RNU16253)と比較した図を示す。黒く塗った部分は一致しているアミノ酸残基を示す。下線部分は、PCRで使用したプライマー部分を示す。\*

【図1】

5'側のプライマー配列	
primer TM3-C	CATTACTTGATCGCGACCAACTACAACTGG T G G T G T T
X82466	CACTCATGATGGCCTGCAACTATTTCTGG
X68596	CTTTACTTCCCTGGCCACCAACTACTACTCTGG
U03469	CAATATGGCATCGTGGCCAACCTACTCTGG
U01156	CACTACTGTGGCCACCAACTACTACTCTGG
X59132	CACTACTGCATCATGGCCAACCTACGCATGG
L01406	CATTTCGCCACCATGACCAACTTCAGCTGG
D17516	CACTACTGTGTGTCACACTACTCTGG
Z23279	CACTACTGCGTGGTGTCCAACCTACTCTGG
X75299	CAATTATGTTGTCATGGCTAACCTCTCTGG
L36566	CACTACTGCATCATGGCCAACCTCTCTGG
L23332	CACTACTTCCATGTGACCAACCTCTCTGG
U16253	CACTACTTCGTTGTCACCAACCTCTCTGG
primer TM3-C	5'-CATTACTTGATSGYGRCCAACCTWCWICCTGG-3'
Y: C/T, K: G/T, S: G/C, R: A/G, W: A/T, I: イノシン	

X82466: ヒト カルシトニン受容体  
X68596: ヒト パラチロイド ホルモン受容体  
U03469: ヒト グルカゴン受容体  
U01156: ヒト グルカゴン-ライク ポリペプチド-1受容体  
X59132: ラット セクレチン受容体  
L01406: ヒト グロースホルモン放出ホルモン受容体  
D17516: ヒト ピュイタリー アデニレート サイクレース  
-アクティベート ポリペプチド受容体  
Z23279: ラット ピュイタリー アデニレート サイクレース  
-アクティベート ポリペプチド受容体  
X75299: ヒト パソアクティブ インテスティナル ペプチド受容体  
L36566: ヒト ピップ2受容体  
L23332: ヒト コルチコトロビン放出ファクター受容体  
U16253: ラット コルチコトロビン放出ファクター2受容体

\* 【図6】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターcDNA断片の塩基配列(スタートコドンATGのAを+1とした時の-18～+630)およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図7】本発明のヒトCRF<sub>2</sub>レセプターcDNA断片の塩基配列(スタートコドンATGのAを+1とした時の+631～+1259)およびそれにコードされるアミノ酸配列を示す。

【図8】図6および図7に示したアミノ酸配列をもとに10 作成した、ヒトCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質の疎水性プロットを示す。この図から、TM1～TM7で示す疎水性ドメインの存在が明らかである。

【図9】図6および図7に示したアミノ酸配列を、公知のラットCRF<sub>2</sub>レセプター蛋白質(RNU16253)と比較した図を示す。黒く塗った部分はアミノ酸残基が両者で一致していることを示す。

【図2】

## 3'側のプライマー配列

primer TM7-D の相補配列	TTCCAGGGICTCGTGGTGGCTATCCTCTAC T T TT T G TT
X82466	TTCCAGGGCTTCTTGTTGCGACCATCTAC
X68596	TTCCAGGGATTTTGTCGCAATCATATAC
U03469	TTCCAGGGCTGCTGGTGGCTGCTCTAC
U01156	TTCCAGGGCTGCTGGTGGCCATCTTATAC
X59132	TTCCAGGGCTGGTGGTAGCTGTCCTTTAC
L01406	TTCCAGGGCTTCATTGTTGCCATCCTCTAC
D17516	TTCCAGGGCTTGTGGTGGCTGTTCTAC
Z23279	TTCCAGGGCTTGTGGTGGCTGACTCTAC
X75299	TTCCAGGGTTTGTTGTTGGCTATCCTCTAC
L36566	TTCCAGGGCTGGTGGCTGCTCTAC
L23332	TTCCAGGGCTTCTTGTTGTGCTGTTCTAC
U16253	TTTCAGGGTTCTTGTTGTGTCCTCTAC

primer TM7-D 5'-GTAGARRAYAGCCACMAMRARICCTGRAA-3'  
R:A/G, Y:C/T, M:A/C, I:イノシン

[図3]

9            18            27            36            45            54

5' CAT TAT TTG ATG GCG GCC AAC TAC TGC TGG ATG TTT GTG GAA GGC TGC TAC CTG

-----  
Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu

63            72            81            90            99            108

CAC ACG GCC ATT GTC ATG ACC TAC TCC ACT GAG CGC CTG CGC AAG TGC CTC TTC

-----  
His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys Cys Leu Phe

117            126            135            144            153            162

CTC TTC ATC GGA TGG TGC ATC CCC TTC CCC ATC ATC GTC GCC TGG GCC ATC GGC

-----  
Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly

171            180            189            198            207            216

AAG CTC TAC TAT GAG AAT GAA CAG TGC TGG TTT GGC AAG GAG CCT GGC GAC CTG

-----  
Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu

225            234            243            252            261            270

GTG GAC TAC ATC TAC CAA GGC CCC ATC ATT CTC GTG CTC CTG ATC AAT TTC GTA

-----  
Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val

279            288            297            306            315            324

TTT CTG TTC AAC ATC GTC AGG ATC CTA ATG ACA AAG TTA CGC GCG TCC ACC ACA

-----  
Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr

333            342            351            360            369            378

TCC GAG ACA ATC CAG TAC AGG AAG GCA GTG AAG GCC ACC CTG GTG CTC CTG CCC

-----  
Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro

387            396            405            414            423            432

CTC CTG GGC ATC ACC TAC ATG CTC TTC TTC GTC AAT CCC GGG GAG GAC GAC CTG

-----  
Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu

441            450            459            468            477            486

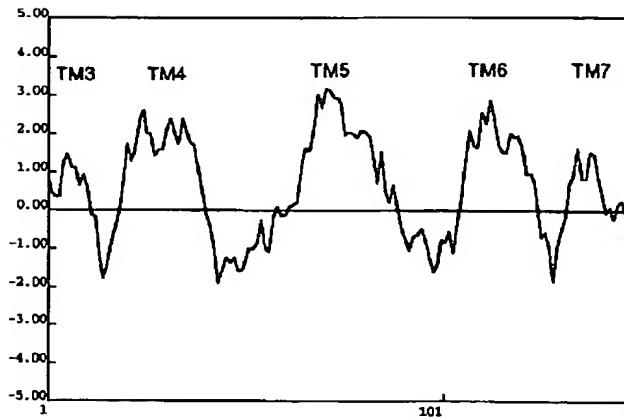
TCA CAG ATC ATG TTC ATC TAT TTC AAC TCC TTC CTG CAG TCG TTC CAG GGC TTC

-----  
Ser Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser

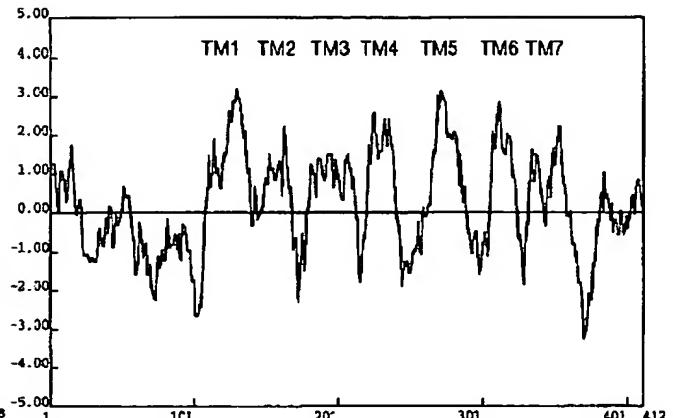
495            504

TTG GTG GCT GTC CTC TAC 3'

【図4】



【図8】



【図5】

	10	20	30	40	50	
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	1 MDAALLSL RANC SLALAE ELLLDG WGE P. PDPEG PYSYC NTTLDQ IGT C	-191 .....	.....	.....	.....	50
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	51 WPQSAPGALV ERPCPEYFNG IKYNITR NAY RECL ENGTWA SRINYSHCEP	-141 .....	.....	.....	.....	100
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	101 ILDDKQRKYD LHY RIALIIN Y LGHC VSVVA LVA AFLLFLV LRSIRC RNV	-91 .....	.....	.....	.....	150
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	151 IHNNLITTFI LRN ITIW FLLQ LIDHEV HEGN EW CRCVTII FN YFWV TFF	-41 .....	.....	.....	.....	200
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	201 W MFVEGCCYLH TAI VM TYSTE H EKKWLF LFLFI GNC ICP PIIV AW A V GKLYYE	10 W MFVEGCCYLH TAI VM TYSTE R EKKWLF LFLFI GNC ICP PIIV AW A V GKLYYE	220 .....	230 .....	240 .....	250 .....
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	251 NECCWFGKEF GDLV EYI YQQ PIIL VLL LINE VFL FNIV FVIL MTKL RASTTS	63 NECCWFGKEF GDLV D YI YQQ PIIL VLL INF VFL FNIV RIL MTKL RASTTS	270 .....	28C .....	290 .....	300 .....
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	310 ETIQYRKAVK ATLV LL PLLG ITYML FFVNP GEDDL SQI UF IYF NSFL QSF	110 ETIQYRKAVK ATLV LL PLLG ITYML FFVNP GEDDL SQI MF IYF NSFL QSF	320 .....	330 .....	340 .....	350 .....
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	360 CGF FV SVFYC FF NG E VRS AL RKR W HRW QDH HAL RV PVARA MSI P TS PTR I	160 CGH L VAV L Y .....	370 .....	380 .....	390 .....	400 .....
RNU16253, RAT hs-AH1,5-3,a	410 SFHSIK QTA A V .....	210 .....	420 .....	430 .....	440 .....	450 .....
						259

【図6】

-10                    1                    36

5' ACG CGG CTG CGG GAC GCG ATG GAC GCG GCA CTG CTC CAC AGC CTG CTG GAG GCC  
Met Asp Ala Ala Leu Leu His Ser Leu Leu Glu Ala

90                    144                    198                    252                    306                    360                    414                    468                    522                    576                    630

AAC TGC AGC CTG GCG CTG GCT GAA GAG CTG CTC TTG GAC GGC TGG CCC CCA CCC  
Asn Cys Ser Leu Ala Leu Ala Glu Glu Leu Leu Leu Asp Gly Trp Gly Pro Pro

CTG GAC CCC GAG GGT CCC TAC TCC TAC TGC AAC ACC TTG GAC CAG ATC GGA  
Leu Asp Pro Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly

ACG TGC TGG CCC CGC AGC GCT GCC GGA GCC CTC GTG GAG AGG CCG TGC CCC GAG  
Thr Cys Trp Pro Arg Ser Ala Ala Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys Pro Glu

TAC TTC AAC GGC GTC AAG TAC AAC ACG ACC CGG AAT GCC TAT CGA GAA TGC TTG  
Tyr Phe Asn Gly Val Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr Arg Glu Cys Leu

GAG AAT GGG ACG TGG GCC TCA AAG ATC AAC TAC TCA CAG TGT GAG CCC ATT TTG  
Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Lys Ile Asn Tyr Ser Gln Cys Glu Pro Ile Leu

GAT GAC AAG CAG AGG AAG TAT GAC CTG CAC TAC CGC ATC GCC CTT GTC GTC AAC  
Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His Tyr Arg Ile Ala Leu Val Val Asn

TAC CTG GGC CAC TGC GTA TCT GTG GCA GCC CTG GTG GCC GCC TTC CTG CTT TTC  
Tyr Leu Glu His Cys Val Ser Val Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe

CTG GCC CTG CGG AGC ATT CGC TGT CTG CGG AAT GTG ATT CAC TGG AAC CTC ATC  
Leu Ala Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile

ACC ACC TTT ATC CTG CGA AAT GTC ATG TGG TTC CTG CTG CAG CTC GTT GAC CAT  
Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Val Met Trp Phe Leu Leu Gln Leu Val Asp His

GAA GTG CAC GAG AGC AAT GAG GTC TGG TGC CGC TGC ATC ACC ACC ATC TTC AAC  
Glu Val His Glu Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn

TAC TTC GTG GTG ACC AAC TTC TTC TGG ATG TTT GTG GAA GGC TGC TAC CTG CAC  
Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His

【図7】

684

ACG CCC ATT GTC ATG ACC TAC TCC ACT GAG CGC CTG CGC AAG TGC CTC TTC CTC  
 ————  
 Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys Cys Leu Phe Leu

738

TTC ATC GGA TGG TGC ATC CCC TTC CCC ATC ATC GTC GCC TGG GCC ATC GGC AAG  
 ————  
 Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys

792

CTC TAC TAT GAG AAT GAA CAG TGC TGG TTT GGC AAG GAG CCT GCC GAC CTG GTG  
 ————  
 Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val

846

GAC TAC ATC TAC CAA GGC CCC ATC ATT CTC GTG CTC CTG ATC AAT TTC GTA TTT  
 ————  
 Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe

900

CTG TTC AAC ATC GTC AGG ATC CTA ATG ACA AAG TTA CGC GCG TCC ACC ACA TCC  
 ————  
 Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser

954

GAG ACA ATC CAG TAC AGG AAG GCA GTG AAG GCC ACC CTG GTG CTC CTG CCC CTC  
 ————  
 Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu

1008

CTG GGC ATC ACC TAC ATG CTC TTC TTC GTC AAT CCC GGG GAG GAC GAC CTG TCA  
 ————  
 Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser

1062

CAG ATC ATG TTC ATC TAT TTC AAC TCC TTC CTG CAG TCG TTC CAG GGT TTC TTC  
 ————  
 Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe

1116

GTG TCT GTC TTC TAC TGC TTC TTC AAT GGA GAG GTG CGC TCA GCC GTG AGG AAG  
 ————  
 Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys

1170

AGG TGG CAC CGC TGG CAG GAC CAT CAC TCC CTT CGA GTC CCC ATG GCC CGG GCC  
 ————  
 Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg Val Pro Met Ala Arg Ala

1224

ATG TCC ATC CCT ACA TCA CCC ACA CGG ATC AGC TTC CAC AGC ATC AAG CAG ACG  
 ————  
 Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr

1259

GCC GCT GTG TGA CCC CTC GGT CGC CCA CCT GCA CA 3'  
 ————  
 Ala Ala Val \*\*\*

[図9]

hCRF2.ami rat CRF2.ami	1	MDAALIISLL MDAALIISLL	10	EANCSLALAE EANCSLALAE	20	ELLLDGWGP ELLLDGWGP	30	LDPEGPYSYC PDPEGPYSYC	40	NITLDQIGTC NITLDOIGTC	50	
hCRF2.ami rat CRF2.ami	51	WPDSAGALV WPDSAGALV	60	ERPCPEYFNG ERPCPEYFNG	70	VKYNTTRKAY IKYNTTRKAY	80	RHCLENGTA RECLENGTA	90	SKINYSOCEP SRINYSHCEP	100	
hCRF2.ami rat CRF2.ami	101	IIDDKQPKYD IIDDKQPKYD	110	LHYRIALVN LHYRIALVN	120	YLGHCVSWAA YLGHCVSWAA	130	LVAAFLLFLA LVAAFLLFLV	140	RSIRCLRIV RSIRCLRIV	150	
hCRF2.ami rat CRF2.ami	151	IHWNLITTFI IHWNLITTFI	160	LRNMWFLLQ LRNITWFLLQ	170	D/DHEVHESN D/DHEVHESN	180	EVWCRCVITPI EVWCRCVITPI	190	FNYFVVTINFF FNYFVVTINFF	200	
hCRF2.ami rat CRF2.ami	201	WMFVEGCCYLH WMFVEGCCYLH	210	TAIVMTYSTE TAIVMTYSTE	220	RLRKCLFLFI HLRKCLFLFI	230	GWCIPFPIIV GWCIPFPIIV	240	AWAVGKLYYE AWAVGKLYYE	250	
hCRF2.ami rat CRF2.ami	251	NEOCWFGKEP NEOCWFGKEP	260	GDLVDVIYQG GDLVDVIYQG	270	PIILVLLINF PIILVLLINF	280	VELFNIVRIL VELFNIVRIL	290	MTKLRASTTS MTKLRASTTS	300	
hCRF2.ami rat CRF2.ami	301	ETIQYRKAVK ETIQYRKAVK	310	ATLVLLPLLG ATLVLLPLLG	320	ITYMLFFVNF ITYMLFFVNF	330	GEDDLSQIMF GEDDLSQIMF	340	TYFNSFLOSF TYFNSFLOSF	350	
hCRF2.ami rat CRF2.ami	351	OQFFVSFYC OQFFVSFYC	360	FFNGEVRSAV FFNGEVRSAV	370	RKRWHRKDH RKRWHRKDH	380	HSLRVPMARA HALRVPMARA	390	MSIPTSPTRJ MSIPTSPTRJ	400	
hCRF2.ami rat CRF2.ami	401	SFHHSIKOTAA SFHHSIKOTAA	410	V..... V.....	420	..... .....	430	..... .....	440	..... .....	450	
	401										450	

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21			C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02			C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/566			G 0 1 N 33/566	
// A 6 1 K 38/00	A A M		A 6 1 K 37/02	A A M
	A B U			A B U
	A D D			A D D
38/04	A A T		37/43	A A T
	A C J			A C J
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:19)				
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:19)				